SYNTHESE ACTH-AKTIVER PEPTIDE UND VON ANTAMANID NACH DER FESTKÖRPERMETHODE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Klaus Hägele
aus Stuttgart

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0076

SYNTHESE ACTH-AKTIVER PEPTIDE UND VON ANTAMANID NACH DER FESTKÖRPERMETHODE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Klaus Hägele
aus Stuttgart

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 1970

Dekan: Prof. Dr. W. Rüdorff

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Eu. Müller

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1967 bis November 1969 unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. E. BAYER

im Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer

danke ich sehr herzlich für sein stetes Interesse und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Hanspaul Hagenmaier möchte ich für viele wertvolle Ratschläge sehr herzlich danken.

MEINEN E L T E R N IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
B	ALLGEMEINER TEIL	4
	1. Grundlagen der Merrifield-Synthese	4
	2. Durchführung der Merrifield-Synthese	5
	a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz	5
	b) Schutzgruppen	5
	c) Abspaltung der Schutzgruppe	6
	d) Kupplung der freien Aminofunktion mit der nächsten N-geschützten Aminosäure	6
	e) Abspaltung der Peptidkette vom Harz	7
	3. Synthese eines Testpeptids zur Bestimmung eventuell gebildeter Fehlersequenzen	7
	4. Synthese der ACTH-Gesamtsequenz 1-39	16
	a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz	16
	b) Aufbau der Peptidkette	16
	c) Abspaltung des Peptids vom Träger	17
	I. Alkalische Abspaltung	17
	II. Abspaltung mit Bromwasserstoff	19
	III. Abspaltung mit Fluorwasserstoff	22
	5. Synthese der Teilsequenz 1-20	24
	a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz	24
	b) Reaktionszyklus	25
	c) Abspaltung vom Harz	28
	I. mit Bromwasserstoff	28
	II. mit Fluorwasserstoff	30

Seite

6. Synthese der ACTH-Sequenz 14-20 35
7. Synthese von Antamanid 45
8. Diskussion 47

C EXPERIMENTELLER TEIL 50

1. Darstellung der tert.-Butyloxy-carbonyl-Aminosäuren 50
a) Darstellung von BOC-Gly-OH 51
b) Darstellung von BOC-Arg(BOC)-OH 51
c) Darstellung von BOC-His-OH 52
I. Nach Schwyzer et.al. 52
II. Aus BOC-His (Bzl)- OH 53
d) Darstellung von BOC-Glycin-p-Nitrophenylester 53

2. Darstellung des Dodekapeptids H-Ala-Phe-(Ala-Phe)$_4$-Ala-Phe-OH 54
a) Veresterung von BOC-Phe-OH mit dem Harz 54
b) Aufbau der Peptidkette 54
c) Abspaltung des Peptids vom Harz 55

3. Synthese von ACTH 1-39 56
a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz 56
b) Aufbau der Peptidkette 57
c) Alkalische Abspaltung 58
d) Abspaltung mit Bromwasserstoff 60
I. Abspaltung der N(Im)- Bzl-Schutzgruppe des Histidins 60
II. Reduktion der Nitro-Schutzgruppen der Arginyl-Reste 61
e) Abspaltung mit Fluorwasserstoff 61

4. Synthese der ACTH-Sequenz 1-20 62
a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz 62

Seite

b) Acetylierung der nicht veresterten Chlormethyl-Gruppen 62
c) Aufbau der Peptidkette 62
d) Abspaltung des Peptids vom Harz 63
I. Mit Bromwasserstoff 63
II. Mit Fluorwasserstoff 64

5. Synthese der ACTH-Sequenz 14-20 65
a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz 65
b) Acetylierung der nicht veresterten Chlormethyl-Gruppen 66
c) Synthesezyklus 66
d) Abspaltung des Peptids vom Harz 67

6. Synthese von Antamanid 68
a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz 68
b) Synthesezyklus 68
c) Abspaltung des Peptids vom Harz 69
d) Cyclisierung des Linearpeptids 69

D ZUSAMMENFASSUNG 70

E LITERATURVERZEICHNIS 71

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BOC	tert.-Butyloxycarbonyl-
Bzl	Benzyl -
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
im-Bzl	Imidazolyl-Benzyl-
MSH	Melanocytenstimulierendes Hormon
P	Polymer
Z	Carbobenzoxy -

Mit Ausnahme von Glycin besitzen alle verwendeten Aminosäuren L-Konfiguration.

A. Einleitung

Das adrenocorticotrope Hormon (Corticotropin), abgekürzt ACTH, ist ein Hormon des Hypophysenvorderlappens, dessen physiologische Wirkung auf einer Stimulierung der Nebennierenrinde beruht. Unter ACTH-Einfluß wird in der Nebennierenrinde die Produktion der Nebennierenrindenhormone gesteigert. Die ACTH-Sekretion und Neusynthese wird vom Zwischenhirn über ein Neurosekret (corticotropin-releasing factor) gesteuert. Besonders unter "Stress" wird vermehrt ACTH gebildet. Im Sinne einer Rückkopplung wird die ACTH-Sekretion durch den erhöhten Corticosteroid-Spiegel gehemmt (Abb. 1).

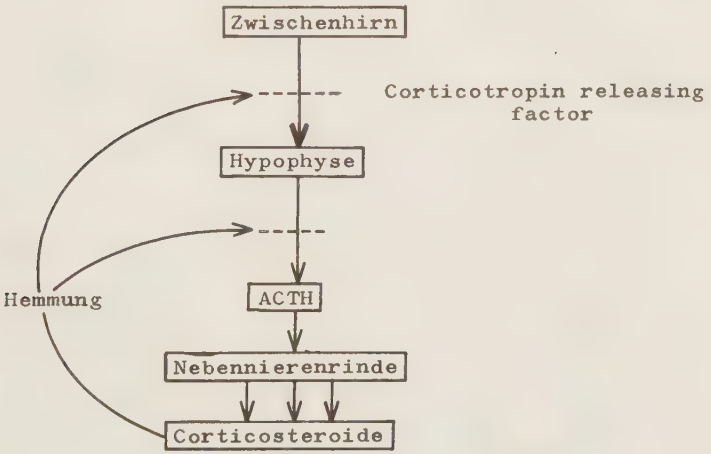

Abb.1: Steuerung der ACTH-Produktion (nach 1)

Die Corticosteroide selbst werden durch die ACTH-Steuerung aus Cholesterin produziert:

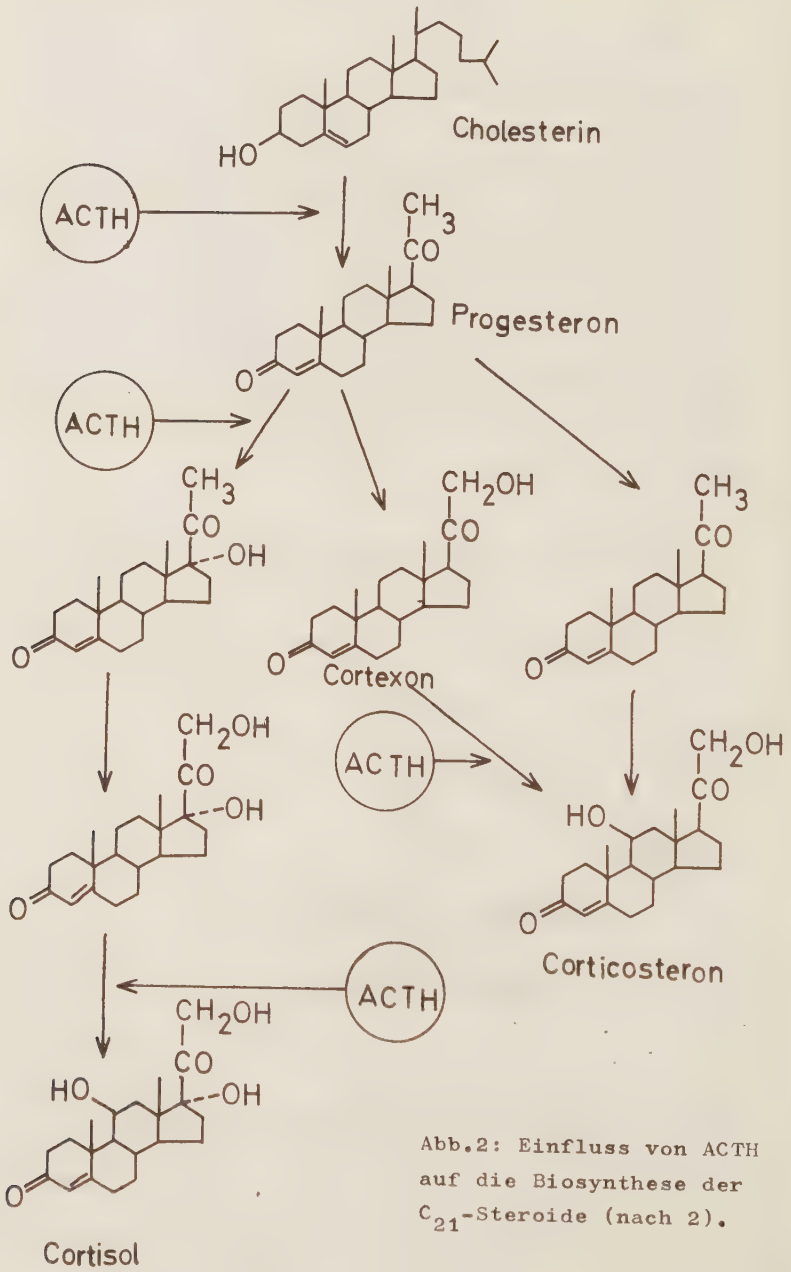

Abb.2: Einfluss von ACTH auf die Biosynthese der C_{21}-Steroide (nach 2).

Reinstes ACTH-actives Peptid wurde zum erstenmal in den Jahren 1953 und 1954 von White (3) und Bell (4) aus Schweinehypophysen und von Li et.al. (5) aus Schafhypophysen isoliert. Die Isolierung des menschlichen Corticotropins gelang Lee et.al. (6) im Jahre 1959.

Die Sequenzaufklärung dieser Corticotropine erfolgte kurz darauf (4,6,7,8). Dabei zeigte es sich, daß die artspezifischen Unterschiede in dem Sequenzteilstück 25-33 lokalisiert sind:

H - Ser -	Tyr -	Ser -	Met -	Glu -	His -	Phe -	Arg
1	2	3	4	5	6	7	8
Try - Gly -	Lys -	Pro -	Val -	Gly -	Lys -	Lys -	Arg
9 10	11	12	13	14	15	16	17
Arg - Pro -	Val -	Lys -	Val -	Tyr -	Pro -	Asp -	Ala
18 19	20	21	22	23	24	25	26
Gly - Glu -	Asp -	Gln -	Ser -	Ala -	Glu -	Ala -	Phe
27 28	29	30	31	32	33	34	35
Pro - Leu -	Glu -	Phe -	OH				
36 37	38	39					

Abb.3: Sequenz des menschlichen Corticotropins

Mensch	-Asp-Ala-Gly-Glu-Asp-Gln-Ser-Ala-Glu-	
	25	33
Schwein	-Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Gln-Leu-Ala-Glu-	
	25	33
Schaf	-Ala-Gly-Glu-Asp-Asp-Glu-Ala-Ser-Gln-	
	25	33
Rind	-Asp-Gly-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-Ala-Gln-	
	25	33

Abb.4: Artspezifisches Teilstück der Corticotropine

Die Totalsynthese des ß-Corticotropins vom Schwein gelang im Jahre 1963 Schwyzer und Sieber (9).

In dieser Arbeit sollte nun versucht werden, menschliches Corticotropin nach der von R.B.Merrifield entwickelten Festkörpermethode zu synthetisieren (10,11,12).

B. Allgemeiner Teil

1. Grundlagen der Merrifield-Synthese

Bei dieser Peptidsynthese wird die erste Aminosäure, die das Carboxylende des Peptids darstellt, über ihre Carboxylgruppe mit einem chlormethylierten polymeren Träger verknüpft, wobei die Aminofunktion der Aminosäure geschützt ist. Durch Abspaltung der N-Schutzgruppe und Ankupplung der nächsten N-geschützten Aminosäure wird die Peptidkette stufenweise vom C-terminalen Ende des Peptids her aufgebaut. Dabei wird versucht, durch einen Überschuß an eingesetzter Carboxyl-Komponente den Umsatz pro Kupplungsschritt auf 100 % zu steigern. Erst nach beendetem Synthesevorgang wird die Peptidkette vom Träger abgelöst.

Der große Vorteil dieser Art der Peptidsynthese beruht darauf, daß das Peptid an einen unlöslichen Träger gebunden ist. Dadurch lassen sich nicht umgesetzte N-geschützte Aminosäuren und unerwünschte Nebenprodukte bei jedem einzelnen Syntheseschritt leicht durch Auswaschen des Harzes mit geeigneten Lösungsmitteln entfernen. Da so die lästigen und zeitraubenden Reinigungsvorgänge der klassischen Peptidsynthese wegfallen, ermöglicht die

Merrifield-Synthese einen bequemeren Weg zur Synthese von Peptiden. Nach der Merrifield-Methode wurden bisher unter anderem folgende Peptide synthetisiert:

Bradykinin	(13)
Angiotensin	(14)
Insulin	(15)
Apoferredoxin	(16)
Oxytocin	(17) (18) (19)
Ribonuclease A	(20)

2. Durchführung der Merrifield-Synthese

a) Verknüpfung der ersten Aminosäuren mit dem Harz

Die an der α-Aminogruppe geschützte Aminosäure wurde in Gegenwart von Triäthylamin mit der Chlormethyl-Gruppe eines chlormethylierten Polystyrol-Harzes (BIO-RAD), welches zu 2 % mit Divinylbenzol vernetzt ist, zum Benzylesterderivat umgesetzt.

b) Schutzgruppen

Als Schutzgruppe der -Aminofunktion der Aminosäuren wurde in dieser Arbeit stets die auch von Merrifield angewandte t-Butyloxycarbonyl-Gruppe verwendet. Sie hat den Vorteil der leichten und schnellen Abspaltbarkeit mit 1N-Chlorwasserstoff in Eisessig, wobei nur gasförmige Reaktionsprodukte entstehen. Da Carbobenzoxy-, Benzyl- und Nitro-Gruppe gegenüber der Einwirkung von 1N-Chlorwasserstoff/Eiseessig stabil sind, gelingt es auf diese Weise, die ß-bzw. -Carboxylgruppe von Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure als Benzylester zu schützen. Serin wurde als Boc-L-Ser (O-Benzyl) - OH,

Tyrosin als BOC-L-Tyr (O-Benzyl) - OH, Lysin als -BOC- -Z-L-Lys-OH und Arginin als -BOC- -Nitro-L-Arg-OH eingeführt.

c) Abspaltung der Schutzgruppe

Die t-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wurde acidolytisch durch 1N-Chlorwasserstoff in Eisessig abgespalten, indem man dieses Agens 40 Minuten lang einwirken ließ. Nach kinetischen Untersuchungen von G.Losse et.al. (21) mit Bromwasserstoff unterschiedlicher Normalität in Eisessig kann auch für Chlorwasserstoff eine ähnlich vollständige Abspaltung der BOC-Gruppe in dieser Zeit angenommen werden. Dies wurde am Beispiel des BOC-L-Lys (Z)-OH auch gezeigt (22). Mit Triäthylamin wird dann die Aminogruppe in Freiheit gesetzt. Das hierbei gebildete Triäthylammoniumhydrochlorid ließ sich argentometrisch nach Volhard bestimmen und ergab so ein quantitatives Maß für die wieder zur Kupplung verfügbaren freien Aminofunktionen.

d) Kupplung der freien Aminofunktion mit der nächsten N-geschützten Aminosäure

Die so freigesetzte Aminofunktion reagierte mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungsreagens (23) mit der nächsten BOC-Aminosäure. Sowohl BOC-Aminosäure als auch DCCI wurden dabei in 5 bis 10 fachem Überschuß, gelöst in Methylenchlorid, eingesetzt, um einen möglichst 100%igen Umsatz zu garantieren. Nach Auswaschen der Überschüsse und des gebildeten Dicyclohexylharnstoffs wiederholte man diesen Synthesezyklus mit der nächsten Aminosäure.

e) Abspaltung der Peptidkette vom Harz

Nach Ankuppeln der letzten Aminosäure wurde das Harz in Trifluoressigsäure suspendiert und Bromwasserstoff durchgeleitet. Nach Abziehen der Trifluoressigsäure bis auf ca. 1-2ml wurde die Peptidlösung in Diäthyläther gegossen und das ausgefallene Produkt isoliert.

3. Synthese eines Testpeptids zur Bestimmung eventuell gebildeter Fehlersequenzen

Bei der Merrifield-Synthese kann nur durch 100%igen Umsatz bei jedem Kupplungsschritt das Auftreten von Fehlersequenzen vermieden werden. Wie von E. Bayer et.al. (24,25) gezeigt wurde, steigt die Zahl der Fehlersequenzen exponentiell mit zunehmender Kettenlänge. Dabei muß zwischen Rumpfsequenzen und Fehlersequenzen unterschieden werden. Bei den Rumpfsequenzen fehlen Aminosäuren vom Aminoende des Peptids her, bei den Fehlersequenzen fehlen Aminosäuren in der Kette. Kann die Rumpfsequenz in späteren Kupplungsschritten nicht mehr reagieren, so bildet sich keine Fehlersequenz. Dadurch wird die Isolierung des erwünschten Peptids sehr viel einfacher, als wenn alle theoretisch-möglichen Fehlsequenzen vorkommen. Abb.6 zeigt die möglichen Fehler- und Rumpfsequenzen für ein Pentapeptid.

Es ist nun zu beachten, daß sich neben der Zahl der verunreinigenden Peptide auch ihre statistische Verteilung ändert (25). Abb. 7 und 8 zeigen diese Verteilung bei der Annahme von 90 % und 99 % Umsatz in jedem Kupplungsschritt während der Synthese eines Dodekapeptids.

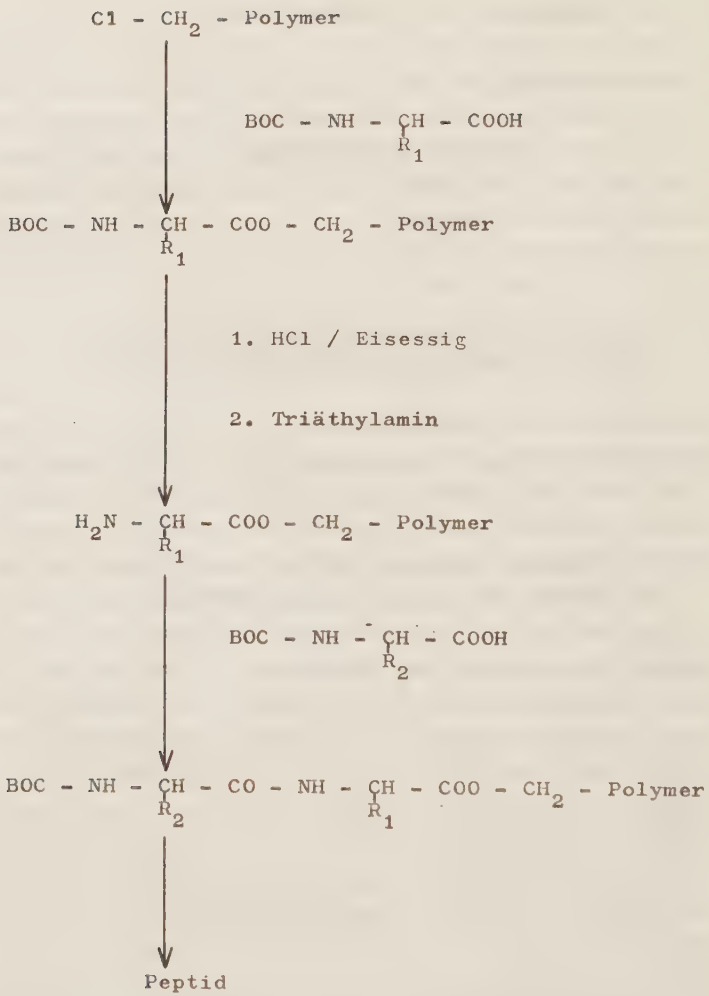

Abb.5: Schema des Aufbaus der Peptidkette nach der Merrifield-Methode

Man sieht, daß Rumpfsequenzen über den gesamten Molekulargewichtsbereich verteilt sind, während Fehlersequenzen bei den höheren Peptiden angereichert sind.

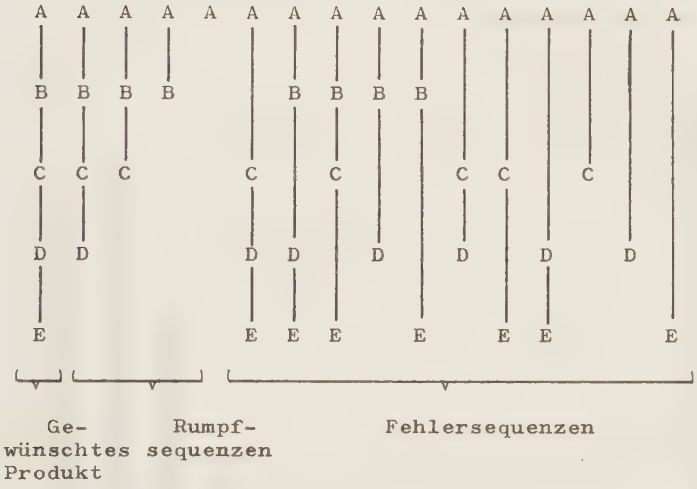

Abb.6: Mögliche Fehlsequenzen bei der Festkörpersynthese eines Pentapeptids A-B-C-D-E.

Daraus ergibt sich ein Verhältnis

Mono- : Di- : Tri- : Tetra- : Pentapeptid

= 1 : 4 : 6 : 4 : 1

Auch erkennt man deutlich, daß bei 99 % Ausbeute das Verhältnis des gewünschten Dodekapeptids zu den 11 verunreinigenden Undekapeptiden gegenüber der 90 % igen Ausbeute deutlich verbessert wird. Die Reinigung des gewünschten Produkts von Fehlersequenzen wird dabei mit zunehmendem Molekulargewicht immer schwieriger. Dies gilt besonders, wenn die Ausbeute pro Kupplungsschritt klein ist. Für ein Polypeptid, wie das Apoferredoxin

mit 55 Aminosäuren ergibt sich, bei 90 % Umsatz pro Kupplungsschritt, eine Ausbeute des gewünschten Produkts von weniger als 1 Gewichtsprozent gegenüber 99 Gewichtsprozent an anderen Fehlsequenzen. Bei 99 % Umsatz entstehen bereits etwa 75 Gewichtsprozent an gewünschtem Produkt.

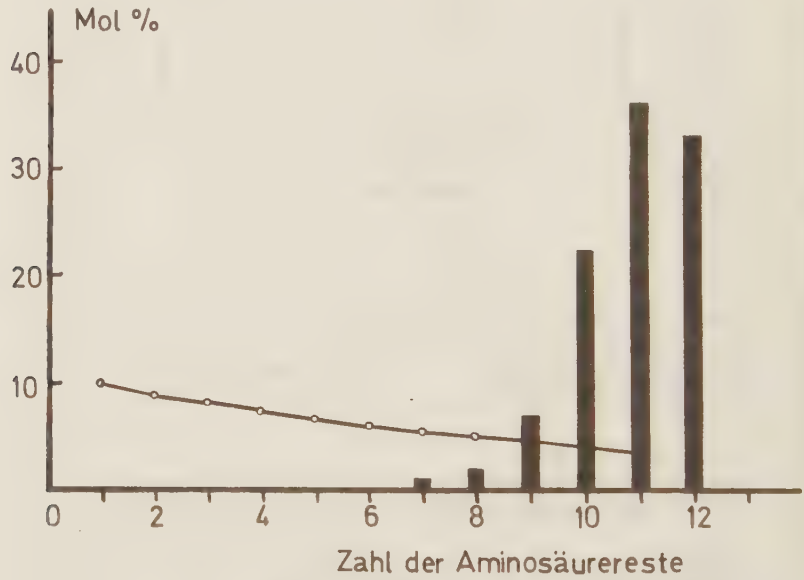

Abb.7: Verteilung der Fehlpeptide bei der Synthese eines Dodekapeptids mit 90 % Ausbeute in jedem Kupplungsschritt.
Durchgezogene Linie: Bildung von Rumpfsequenzen
Blöcke: Bildung von Fehlersequenzen

Das heißt, es wird nur im zweiten Fall möglich sein, das Polypeptid von den Verunreinigungen zu trennen. Dagegen lassen sich Rumpfsequenzen wesentlich besser entfernen, da im Falle eines 99 % igen Umsatzes nur 1 Peptid mit einer Aminosäure weniger als das gewünschte Produkt

entsteht und zwar in diesem Fall nur in 1 % Ausbeute.

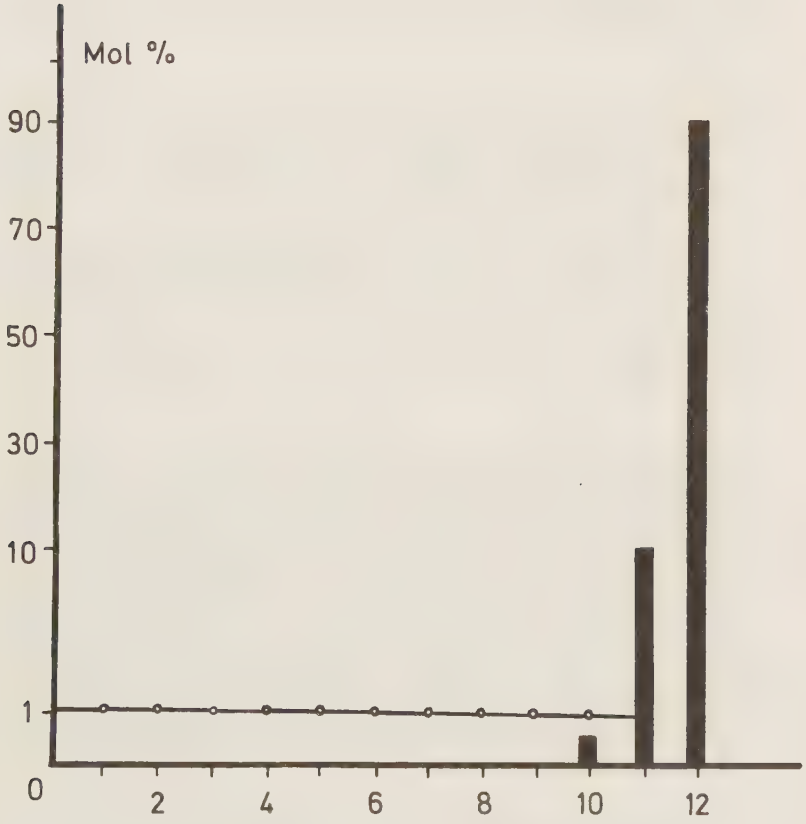

Abb.8: Verteilung der Fehlpeptide bei der Synthese eines Dodekapeptids mit 99 % Ausbeute in jedem Kupplungsschritt.
Durchgezogene Linie: Bildung von Rumpfsequenzen
Blöcke: Bildung von Fehlersequenzen

Bei Polypeptidketten mit 100 und mehr Aminosäureresten wird selbst bei 99 % Umsatz das Verhältnis von gewünschtem Produkt zu Nebenprodukten so ungünstig, daß eine Synthese einheitlicher Proteine mit der Technik der Festkörpersynthese immer unwahrscheinlicher wird.

Infolge des Fehlens geeigneter Trenn- und Identifizierungsmethoden ist auch eine Kontrolle des Syntheseprodukts in diesem Molekulargewichtsbereich unzureichend.

Die Vernunftsgrenze beim heutigen Stand der Festkörpermethode dürfte somit bei ca. 60 Aminosäureresten liegen. Das ist das Doppelte der von Schwyzer (9) durch Fragmentkondensation erreichten Zahl von 39 Aminosäureresten beim ACTH.

Die Racemisierungsgefahr scheint dagegen bei der Merrifield-Methode gering zu sein, wie von E.Bayer und H. Hagenmeier (17) am Beispiel des biologisch-vollaktiven Oxytocins gezeigt wurde. Auch konnten E.Bayer, E.Gil-Av et.al. (72) bei der Untersuchung verschiedener Peptide nach der Hydrolyse nie mehr als 1 % D-Aminosäuren nachweisen. Da dieser Anteil von D-Aminosäuren auch bei der Hydrolyse sterisch einheitlicher Peptide gefunden wird, ist nachgewiesen, daß bei der Merrifield-Methode keine Racemisierung eintritt.

Die Hauptschwierigkeit zu bestimmen, ob Rumpf- oder Fehlersequenzen auftreten, liegt im Mangel geeigneter analytischer Methoden. Diese sind nicht empfindlich genug kleine Anteile an Fehlsequenzen nachzuweisen (26,27,28).

Aus diesem Grund sollte nun versucht werden, durch die Synthese eines Polypeptids mit sich wiederholender

Sequenz $(A - B)_x$ die Erfassungsgrenze beim Auftreten von Fehlersequenzen A - A oder B - B wesentlich zu steigern. Rumpfsequenzen zeigen sich im Auftreten der Dipeptide A - B oder B - A die wie die Fehlersequenzen A - A und B - B durch Partialhydrolyse entstehen. Die Erfassungsgrenze steigt dabei mit dem Wiederholungsfaktor x.

Die nach Partialhydrolyse erhaltenen Dipeptide wurden als N - Trifluoracetylester mittels Gas-Chromatographie getrennt. Höhere Peptide wurden mittels Flüssigkeits-Chromatographie an Sephadex G-15 getrennt und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert (28,29,30).

Als Testpeptid wurde das Dodekapeptid H-Ala-Phe-$(Ala-Phe)_4$-Ala-Phe-OH ausgewählt.

Die Veresterung der ersten Aminosäure BOC-Phe-OH mit dem chlormethylierten Harz erfolgte durch 48-stündiges Rückflußkochen in Äthanol unter Zusatz von Triäthylamin. Nach Auswaschen des Harzes mit DMF und Äthanol wurde die BOC-Gruppe durch 1N-Chlorwasserstoff in Eisessig abgespalten und das entstandene Hydrochlorid mit Triäthylamin neutralisiert. Das dabei gebildete Triäthylammoniumchlorid wurde nach Volhard titriert. Die Beladung des Harzes mit BOC-Phe-OH wurde dabei zu 0,34 mMol/g Harz bestimmt.

Zur Kupplung wurden die BOC-Aminosäuren und das DCCI in jeweils 4,75-fachem Überschuß eingesetzt. Während der ganzen Synthese blieb die titrierte Menge an freier Aminosäure konstant bei 0,34 mMol/g Harz. Nach beendetem Synthesevorgang wurde das BOC-Ala-Phe-$(Ala-Phe)_4$-Ala-Phe-Harz getrocknet und das Peptid mit Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure innerhalb 90 Minuten abgespalten.

Aus dem Filtrat fällte man das Peptid mit Äther. Man erhielt 1,48mMol Peptid =88 % d.Th., bezogen auf das erste am Harz veresterte Phenylalanin.

Die Hydrolyse einer Probe mit 6N HCl bei 110°C (96 Stunden) zeigte, daß das synthetisierte Produkt in dieser Zeit noch nicht vollständig in Lösung gegangen war. Das Verhältnis Ala : Phe wurde durch Aminosäureanalyse zu 1,00 : 0,94 bestimmt. Es zeigte sich dabei, daß nur 78 % des synthetisierten (Ala - Phe)$_6$. HBr vollständig hydrolisiert waren. Ein weiterer Nachteil dieses Dodekapeptids war seine geringe Löslichkeit in konventionellen Lösungsmitteln: Das Peptid war nur in Trifluoressigsäure und Ameisensäure löslich.

Das nach der selben Methode synthetisierte Dodekapeptid H-Leu-Ala-(Leu-Ala)$_4$-Leu-Ala-OH (28,73), ergab bei einer Beladung des Harzes mit BOC-Ala-OH von 0,39 mMol pro Gramm Harz ein Verhältnis von Ala : Leu = 1,00 : 0,97. Partialhydrolyse mit konzentrierter Salzsäure und Herstellung der N-Trifluoracetyl-Ester zeigte, daß bei beiden Synthesen Fehlersequenzen nachweisbar sind (Tabelle 1).

Das Fehlen von Ala-Ala erklärt sich durch eine wesentlich schnellere Spaltung der Ala-Ala-Peptidbindung bei der Hydrolyse.

Um die Entstehung von Fehlersequenzen zu unterbinden, müssen Aminogruppen, die im Kupplungsschritt nicht reagierten, vor einer Reaktion in späteren Kupplungsschritten blockiert werden. Merrifield hatte hierfür die Acetylierung der Aminofunktion vorgeschlagen (31), sie jedoch in späteren Arbeiten nicht weiter angewandt.

Hydrolyse von $(Leu\text{-}Ala)_6$		Hydrolyse von $(Ala\text{-}Phe)_6$	
Peptid	Gehalt in %	Peptid	Gehalt in %
Ala-Ala	1,35	Ala-Ala	negativ
Leu-Ala	67,50	Phe-Ala	39,7
Ala-Leu	28,53	Ala-Phe	51,0
Leu-Leu	2,62	Phe-Phe	9,3

Tabelle 1 : Ausbeute an Dipeptiden ohne Acetylierung (gefunden durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie nach Säurehydrolyse der Dodekapeptide)

Das von H. Eckstein (32) synthetisierte Dodekapeptid $(Leu\text{-}Ala)_6$ wurde nun ein zweites Mal synthetisiert. Nach jeder Kupplung wurde das Harz nun mit DMF gewaschen und mit einer Mischung von 35 mMol Acetanhydrid in einer 3 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF behandelt. Freie Aminogruppen wurden so acetyliert. Nach Abspaltung, Hydrolyse und Aminosäureanalyse ergab sich ein Verhältnis Leu : Ala = 1,0 : 1,0 .

Das Ergebnis der bestimmten Fehlersequenzen zeigt Tabelle 2:

Peptid	Gehalt in %
Ala-Ala	0,1
Leu-Ala	70,0
Ala-Leu	29,3
Leu-Leu	0,1

Tabelle 2 : Ausbeute an Dipeptiden mit Acetylierung

4. Synthese der ACTH - Gesamtsequenz 1 - 39

a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz

Die Carboxylgruppe von Phenylalanin wurde durch 24-stündiges Rückflußkochen in Äthanol, unter Zusatz von Triäthylamin, mit der Chlormethylgruppe des polymeren Trägers verknüpft. Phenylalanin wurde dabei als BOC-L-Phe-OH eingesetzt.

Die Beladung des Harzes wurde durch Hydrolyse einer Probe mit 6N - Salzsäure und anschließender Aminosäureanalyse zu 0,46 mMol/g bestimmt.

Die Chloridtitration nach der Abspaltung der BOC-Gruppe mit 1N-Chlorwasserstoff in Eisessig und Neutralisation des Hydrochlorids mit Triäthylamin ergab in guter Übereinstimmung 0,44 mMol/g.

b) Aufbau der Peptidkette

Die so freigesetzte Aminofunktion wurde mittels DCCI als Kupplungsreagens, wie oben beschrieben, mit der nächsten N - geschützten Aminosäure umgesetzt. Mehrfunktionelle Aminosäuren wurden, wie unter Abschnitt 2/b beschrieben, eingeführt. Weiterhin wurden Histidin als N (α)-BOC-N (Im)-Benzyl-Histidin, Glutamin und Glycin als BOC - Aminosäure - p - Nitrophenylester (33,34,35) eingesetzt.

Die BOC - Gruppe der Sequenz Nr. 7 und 6 (Phe,His) spaltete man jeweils mit wasserfreier Trifluoressigsäure innerhalb 40 Minuten ab, um eine Zersetzung des säurelabilen Indolrings des Tryptophans (Sequenz Nr.9) zu vermeiden. Da hierbei jedoch trotzdem rötliche Ver-

färbungen des Harzes auftraten, die sich beim Waschen des Harzes mit Äthanol entfernen ließen, wurde auf die von E.Wünsch et. al. (36) beschriebene Anwendung von Indol zurückgegriffen und die BOC-Schutzgruppe weiterhin mit 1N-HCl / Eisessig unter Indol-Zusatz abgespalten.

Das Indol wurde jedoch vom Harz stark adsorbiert und erst beim Neutralisationsschritt mit Triäthylamin / DMF ausgewaschen. Da das Indol die Chlorid-Titration stark verfälschte, mußte auf eine weitere Titration der freien Aminogruppen verzichtet werden.

c) Abspaltung des Peptids vom Träger

Nach Ankuppeln der letzten Aminosäure (BOC - Ser(OBzl)-OH) wurde das Harz mehrmals mit verschiedenen Lösungsmitteln gewaschen und getrocknet.

Das Abspalten des Peptids vom Harz erfolgte nach 3 Verfahren. Die jeweils erhaltenen Produkte wurden getrennt aufgearbeitet.

I. Alkalische Abspaltung

Das am Harz verknüpfte, teilgeschützte Peptid

BOC - Ser(OBzl) - Tyr(OBzl) - Ser(OBzl) - Met - Glu(OBzl) - His(im-Bzl) - Phe - Arg(NO_2) - Try - Gly - Lys(Z) - Pro - Val - Gly - Lys(Z) - Lys(Z) - Arg(NO_2)- Arg(NO_2) - Pro - Val - Lys(Z) - Val - Tyr(OBzl) - Pro- Asp(OBzl) - Ala - Gly - Glu(OBzl) - Asp(OBzl) - Gln - Ser(OBzl) - Ala - Glu(OBzl) - Ala - Phe - Pro - Leu - Glu(OBzl) - Phe - Polymer wurde unter Rühren in eine Lösung von 26 mMol Natrium in Äthanol gegeben. Nach 5 Stunden wurde abfiltriert und das Harz erneut für weitere 19 Stunden in Natriumalkoholat gerührt. Nach Abfiltrieren

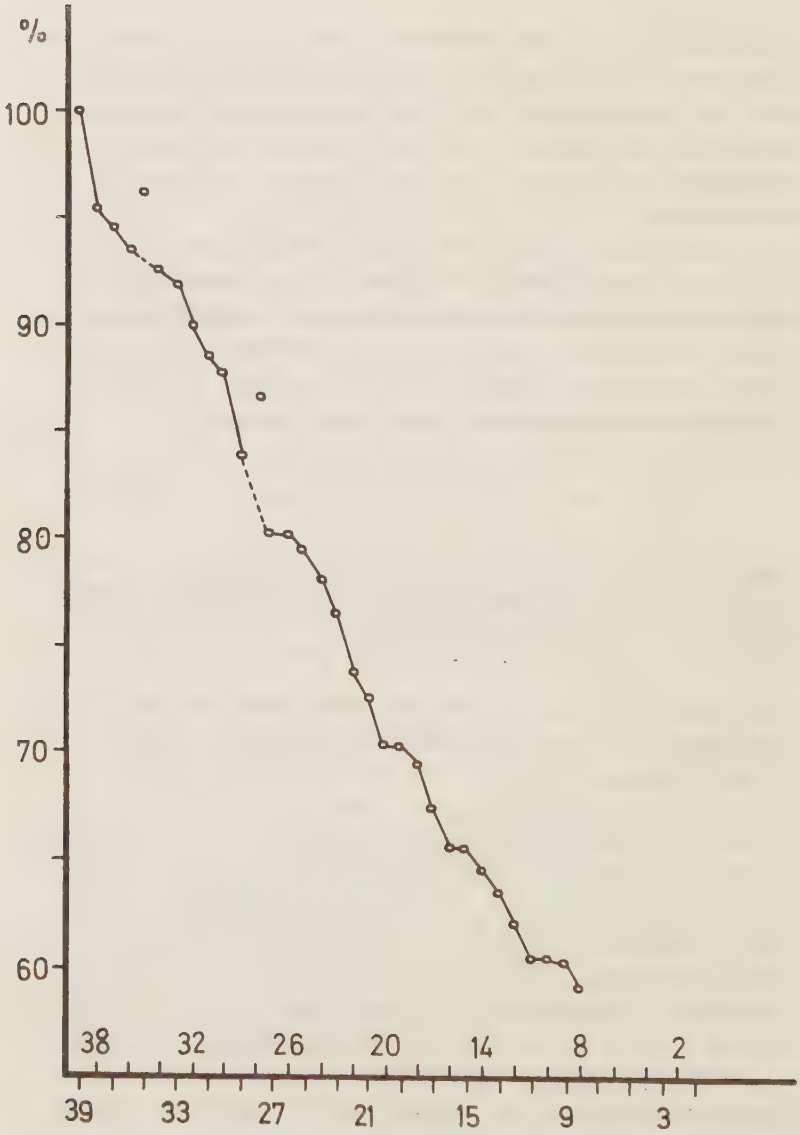

Abb.9: Abnahme freier Aminofunktion im Verlauf der Synthese bestimmt durch argentometrische Chlorid-Titration.
(% bezogen auf NH_2-Äquivalente der ersten Aminosäure).

vom Harz wurden die beiden Filtrate mit 20 %iger Zitronensäure versetzt bis ein Niederschlag ausfiel. Zur Abspaltung der BOC-Gruppe am N - terminalen Serin wurde in Trifluoressigsäure aufgenommen und diese am Rotationsverdampfer abgezogen.

Das erhaltene Peptid, das noch die N(Im)-Benzyl-Gruppe am Histidin, die ε-Carbobenzoxy-Gruppe am Lysin und die ω-Nitro-Gruppe am Arginin enthielt, hydrierte man nun in Methanol / Eisessig unter Zusatz von Bortrifluorid-Ätherat (37,38) mit frischgefälltem Palladiumschwarz als Katalysator. Diese Lösung wurde nach Einengen im Vakuum auf eine Sephadex G-50 - Säule aufgetragen und mit Wasser / Methanol = 1 : 1 als Laufmittel eluiert. Das Eluat wurde eingeengt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde anschließend in wenig Methanol gelöst und mit Diäthyläther umgefällt.

Die Analysenwerte der Aminosäureanalyse finden sich in Tabelle 3. Tryptophan wurde photometrisch mit Ehrlich's Reagens (39) bestimmt und ergab 0,89 Mol (theoretisch 1Mol) Tryptophan per Mol Peptid. Da die Elektrophorese bei 500 Volt jedoch insgesamt 7 Ninhydrin-positive Substanzen ergab, wurde auf eine weitere Charakterisierung verzichtet.

II. Abspaltung mit Bromwasserstoff

Das Peptid - Harz wurde in Trifluoressigsäure, welcher Indol und Methyläthylsulfid zugesetzt war, aufgeschlämmt. Diese Zusätze waren nötig, um Methionin und Tyrosin vor einer Benzylierung und Tryptophan vor einem zu starken Säureabbau zu schützen. Nach einstündigem Durchleiten von Bromwasserstoff trennte man das Harz ab. Nach Einengen des Filtrats wurde zum Fällen des Peptids auf

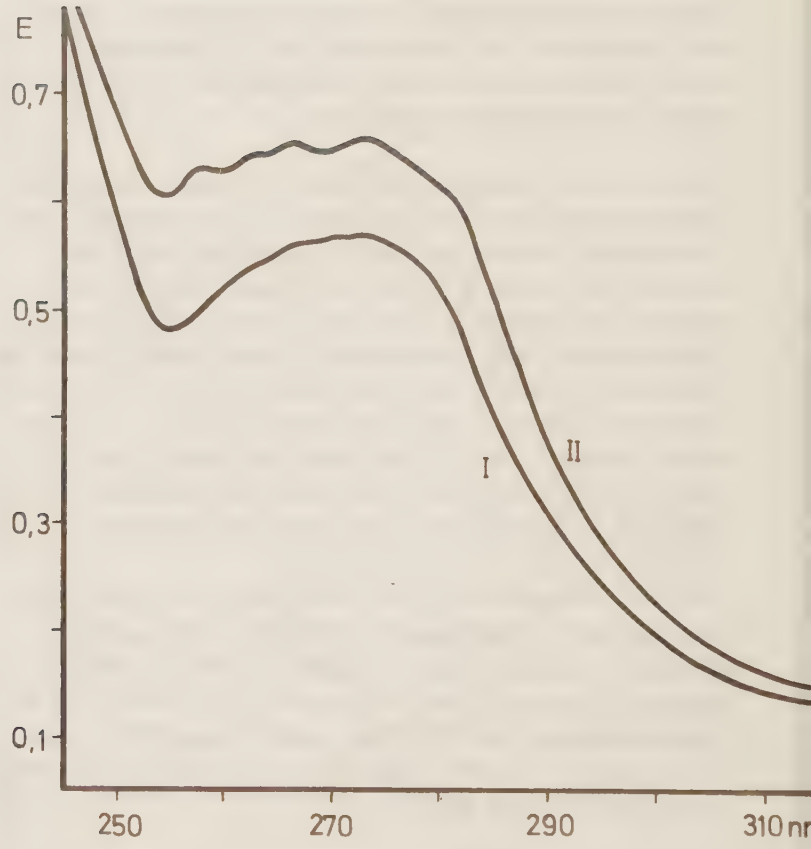

Abb.10: Lichtabsorptionsspektrum des synthetischen ACTH in Methanol / Wasser = 1 : 1
Gemessen mit einem PMQ II - Spektrometer
Schichtdicke 1 cm
I alkal.Abspaltung (nach Reinigung und Gefriertrocknung)
II BBr - Abspaltung (nach Gefriertrocknung)

Äther gegossen. Die Reinigung erfolgte über eine Dowex 2X10 Säule mit Wasser / Methanol als Laufmittel. Das Eluat wurde eingeengt und dann lyophilisiert.

Das so erhaltene Peptid, das noch die N(Im)-Benzyl-Schutzgruppe am Histidin und die ω- Nitro-Schutzgruppe am Arginin enthielt, wurde zur Abspaltung der N(Im)-Benzyl-Gruppe in flüssigem Ammoniak gelöst und die Schutzgruppe mit Natrium entfernt (40). Hierbei wird nach J.Blake und C.H.Li (41) Methionin nicht zum Homocystein demethyliert. Die Blaufärbung wurde auf 90 Sekunden beschränkt.

Nach Abziehen des Ammoniaks im Vakuum wurde das zurückgebliebene Produkt in Eisessig aufgenommen und durch Zugabe eines zehnfachen Überschusses von Zink die Nitrogruppen der Arginyl-Reste reduziert.

Das danach lyophilisierte Produkt wurde in 10 %iger Essigsäure, der wenige Tropfen Trifluoressigsäure zugesetzt waren, gelöst und über eine Sephadex G-50 Säule mit 10 %iger Essigsäure eluiert. Die nach Gefriertrocknung erhaltene Substanz ergab ein typisches Peptid-Lichtabsorptionsspektrum (Abb.10). Sie verhielt sich im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel einheitlich und zeigte Ninhydrin-, Sakaguchi- und Ehrlich-positive Reaktionen. Im Test nach Sayers (42) ergaben sich ca. 3 I.E. / mg.

III. Abspaltung mit Fluorwasserstoff[1)]

Nach Sakakibara (43) wird Tryptophan von wasserfreiem, flüssigem Fluorwasserstoff unter Anisol-Zusatz nicht angegriffen. Das so erhaltene Peptid-Harz-Gemisch wurde mehrmals mit Trifluoressigsäure gewaschen und das Harz abfiltiert. Das Peptid wurde mit Äther gefällt und getrocknet. Durch HF werden gleichzeitig auch die NO_2-Schutzgruppen der Arginyl-Reste reduziert (61). Die Abspaltung der noch vorhandenen N(Im)-Benzyl-Gruppe am Histidin erfolgte mit Natrium in flüssigem Ammoniak (4o).

Nach Abziehen des Ammoniaks im Wasserstrahlvakuum wurde der Rückstand in Essigsäure / Methanol gelöst und über eine Sephadex G-25 Säule mit 10 %iger Essigsäure als Elutionsmittel eluiert.

Die Werte der Aminosäureanalyse nach Hydrolyse einer Probe mit 6N-HCl im Bombenrohr bei 110° finden sich in Tabelle 3. Im biologischen Test nach Sayers ergab sich eine Aktivität von ca. 1 I.E. / mg.

1) Herrn Dr. E. Schnabel vom Pharmazeutisch-Wissenschaftlichen Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld, danke ich für diese Abspaltungen recht herzlich.

	39-17	39-13	39-4	39-1	Alkal. Abspalt.	HBr Rohprod.	HBr 6N HCL	HBr HCI/AcOH	HF
Asp	2,2:2	1,7:2	1,6:2	2,0:2	2,3	1,7	1,6	1,4	2,1
Ser	1,0:1	0,95:1	1,2:1	2,3:3	1,9	1,6	1,85	1,6	2,8
Glu	4,3:4	4,7:4	6,7:5	4,95:5	5,0	7,0	7,1	7,2	5,6
Pro	2,7:3	2,2:3	2,2:4	3,0:4	3,1	4,2	4,1	4,1	4,7
Gly	1,0:1	1,3:2	3,0:3	2,1:3	2,9	3,0	3,0	3,0	2,6
Ala	3,8:3	3,0:3	4,1:3	3,0:3	4,1	5,1	4,5	5,0	3,4
Val	1,3:2	1,5:3	2,7:3	1,7:3	2,5	1,7	1,8	1,95	3,0
Met	-	-	0,55:1	0,45:1	0,2	0,3	0,15	0,1	0,1
Leu	1,1:1	1,0:1	1,6:1	1,1:1	1,1	2,0	1,8	2,0	0,8
Tyr	0,4:1	0,3:1	0,6:1	1,2:2	0,9	0,7	0,8	0,7	0,7
Phe	2,4:2	2,1:1	3,9:3	2,9:3	3,0	4,4	4,0	4,2	2,6
Lys	1,3:1	2,2:3	3,3:4	3,0:4	3,9	n.b.	3,2	n.b.	4,4
His	-	-	0,6:1	0,6:1	0,4	n.b.	0,2	n.b.	0,15
Arg	-	-	-	- :3	1,1	n.b.	1,95	n.b.	2,3

Tabelle 3: Werte der Aminosäureanalyse im Verlauf der Synthese von ACTH 1 - 39.
(n.b. = nicht bestimmt)

5. Synthese der Teilsequenz 1 - 20

Da die Synthese-Ergebnisse der Gesamtsequenz des ACTH nicht befriedigend waren, sollte die biologisch aktive Teilsequenz 1 - 20 (44) aufgebaut werden, um zu sehen, ob bessere Resultate zu erhalten sind. Dieses Sequenzstück besitzt bis auf einen Glutaminsäure-Rest keine sauren Gruppen mehr. Es sind aber besonders viele basischen Aminosäuren vorhanden:

H - Ser -	Tyr -	Ser -	Met -	Glu -	His -	Phe -	Arg -
1	2	3	4	5	6	7	8
Try -	Gly -	Lys -	Pro -	Val -	Gly -	Lys -	Lys -
9	10	11	12	13	14	15	16
Arg -	Arg -	Pro -	Val -	OH			
17	18	19	20				

a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz

BOC - L - Val - OH wurde durch 48-stündiges Rückflußkochen in Äthanol, bei Zusatz von Triäthylamin in äquimolarer Menge, mit dem chlormethylierten Harz verknüpft.

Um die restlichen, nach der Veresterung der Aminosäure mit dem Harz noch vorhandenen Chlormethylgruppen des Harzes zu entfernen, wurde dieses mit einer 4 %igen Lösung von Triäthylamin in Dimethylformamid, die zusätzlich 40 mMol Essigsäureanhydrid enthielt, umgesetzt. Das gebildete Triäthylammoniumchlorid wurde anschließend nach Volhard titriert. Es ergab sich ein Gehalt von 0,16 mMol Chlorid-Ionen pro Gramm Harz. Die Beladung des Harzes mit der Aminosäure wurde durch Aminosäureanalyse zu 0,72 mMol / g Harz bestimmt. Da ein Harz der Kapazität 1,03 meq/g verwendet wurde, ergäbe sich somit ein ver-

bleibender Chlormethyl-Gehalt von 0,15 mMol / g. Anders ausgedrückt: Von 1,03 mMol Chlormethylgruppen pro Gramm Harz hatten nach Veresterung mit der BOC-Aminosäure und nach Umsetzung mit Triäthylamin und Acetanhydrid 0,88 mMol = 85,4 % reagiert. Die restlichen Chlormethyl-Gruppen des Harzes schienen einer Reaktion nicht zugänglich zu sein.

b) Reaktionszyklus

Die Abspaltung der BOC-Gruppe erfolgte während der gesamten Synthese mit 1 N-Chlorwasserstoff in Eisessig, jedoch wurde diesem Agens ab Position 9 (Try) 2 % Methyläthylsulfid und 1 % Mercaptoäthanol zugesetzt, um Tryptophan vor säurekatalysierter Oxidation zu schützen (45). Auch wurde ab Sequenz Nr. 9 nur noch unter Stickstoff gearbeitet.

Mehrfunktionelle Aminosäuren wurden als folgende Derivate eingesetzt:

BOC - Ser (OBzl) - OH, BOC - Tyr (OBzl) - OH,
BOC - Glu (OBzl) - OH, BOC - Arg (BOC) - OH,
BOC - Lys (Z)- OH, N(α) - BOC - His - OH.

Bei der BOC-Abspaltung vom α-tert. Butyloxycarbonyl--ω- tert.- Butyloxycarbonyl - Arginyl-Rest wurde die Guanidino-Gruppe des Arginins protonisiert. Dieses Proton ist gegenüber Basen verhältnismäßig stabil, wie bereits von V. du Vigneaud et.al. (46) und von Gish und Carpenter (47) gezeigt wurde. Da während des ganzen Reaktionsverlaufs als stärkstes basisches Agens nur Triäthylamin eingesetzt wurde, sollte die Guanidino - Gruppe über die ganze Synthese protonisiert bleiben. Durch die Protonisierung der Guanidino-Gruppe entfiel die vorher verwendete ω-Nitro-Gruppe, die den Nachteil hat, daß sie sich bei der Hydrierung von größeren Peptiden oft nur

langsam und unvollständig abspalten läßt. Durch Protonisierung geschütztes Arginin wurde unter anderem bei der Synthese von Arginin-Vasopressin (46) und von Teilsequenzen von ß - MSH (48) verwendet. Auch bei der Kupplung mit DCCI treten keine Schwierigkeiten auf, wie E. Wünsch (49) bei der Totalsynthese des Pankreas-Hormons Glucagon zeigen konnte. Der Imidazol-Ring des Histidins blieb ebenfalls ungeschützt. Am Imidazol-Ring unsubstituiertes Histidin wurde auch bei der Synthese des ß - Corticotropins von R. Schwyzer et.al verwendet (9,48,50, 51).

Die BOC-Aminosäuren wurden in 5 - 10-fachem Überschuß mit einem äquimolaren Überschuß von DCCI als Kupplungsreagens eingesetzt. Nach einer ersten Reaktionszeit von 2 Stunden wurde ausgewaschen und für weitere 2 Stunden mit dem 5 - 10-fachen Überschuß von BOC-Aminosäure und DCCI umgesetzt. F. Weygand und R. Obermeier (62) konnten mittels massenspektrometrischer Verdünnungsanalyse zeigen, daß bei zweimaligem Umsatz mit DCCI und BOC-Aminosäure eine höhere Ausbeute pro Kupplungsschritt erhalten wird.

Um eventuell nicht umgesetzte Aminogruppen zu blokkieren, wurde anschließend an die Kupplung mit einer 4 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF unter Zugabe von 30 mMol Acetanhydrid umgesetzt. In dieser Lösung wurde nach Absaugen vom Harz stets ein beträchtlicher Chlorid-Gehalt nachgewiesen, was auf eine gewisse Ionenaustauschfähigkeit des Harzes schließen läßt: Man kann annehmen, daß das bei der Veresterung der ersten Aminosäure verwendete Triäthylamin an das Harz gebunden wird. Die so gebildeten Triäthylammonium-Gruppen können als Ionenaustauscher wirken. Dem entspricht, daß der gefundene Chlorid-Gehalt gleichbleibend

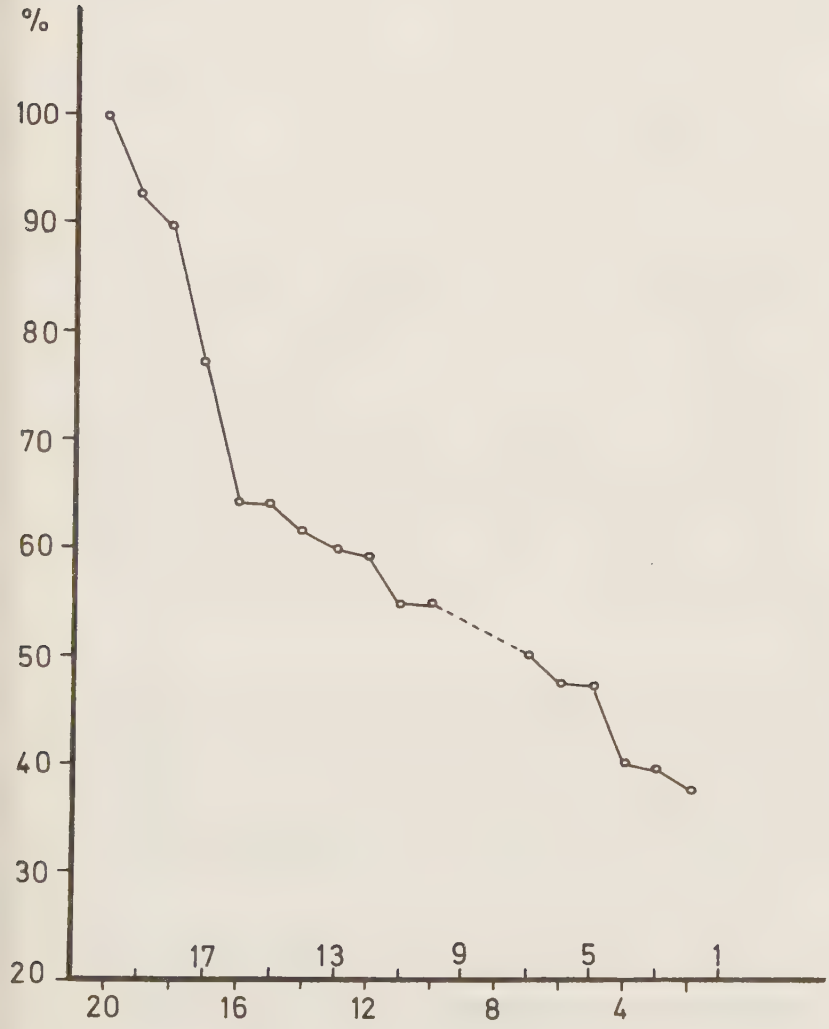

Abb.11: Abnahme freier Aminofunktion im Verlauf der Synthese bestimmt durch argentometrische Chlorid-Titration.

zwischen 0,03 und 0,07 mMol pro Gramm Harz schwankt. (Das eingesetzte Harz hatte eine Chlormethyl-Kapazität von 1,03 mMol / g).

c) Abspaltung vom Harz

I. Mit Bromwasserstoff

Das Peptid-Harz wurde in Trifluoressigsäure, die mit HBr gesättigt war, unter Zusatz von Methyläthylsulfid und Mercaptoäthanol aufgeschlämmt. Durch diese Lösung wurde 10 Minuten lang ein Bromwasserstoffstrom geleitet. Nach Absaugen vom Harz wurde das Filtrat eingeengt und das Peptid mit Äther gefällt. Es zeigte sich, daß während dieser kurzen Reaktionszeit nur 30 % der erwarteten Peptidmenge vom Harz abgespalten wurden. Um jedoch sicher zu sein, daß möglichst kein Tryptophan zerfällt, wurde diese kurze Reaktionszeit gewählt.

Nach Reinigung über eine Sephadex G - 25 Säule wurde das Eluat lyophilisiert. Das erhaltene Produkt wies nach alkalischer Hydrolyse und quantitativer Tryptophan-Bestimmung mit Ehrlich's Reagens (39) noch den erwarteten Tryptophan-Gehalt auf: gef. Try 0,86
theor. Try 1,0

Die Analysenwerte der Aminosäureanalyse finden sich in Tabelle 4. Im Test nach Sayers ergab sich eine reproduzierbare ACTH-Aktivität von 2,5 I.E. / mg.

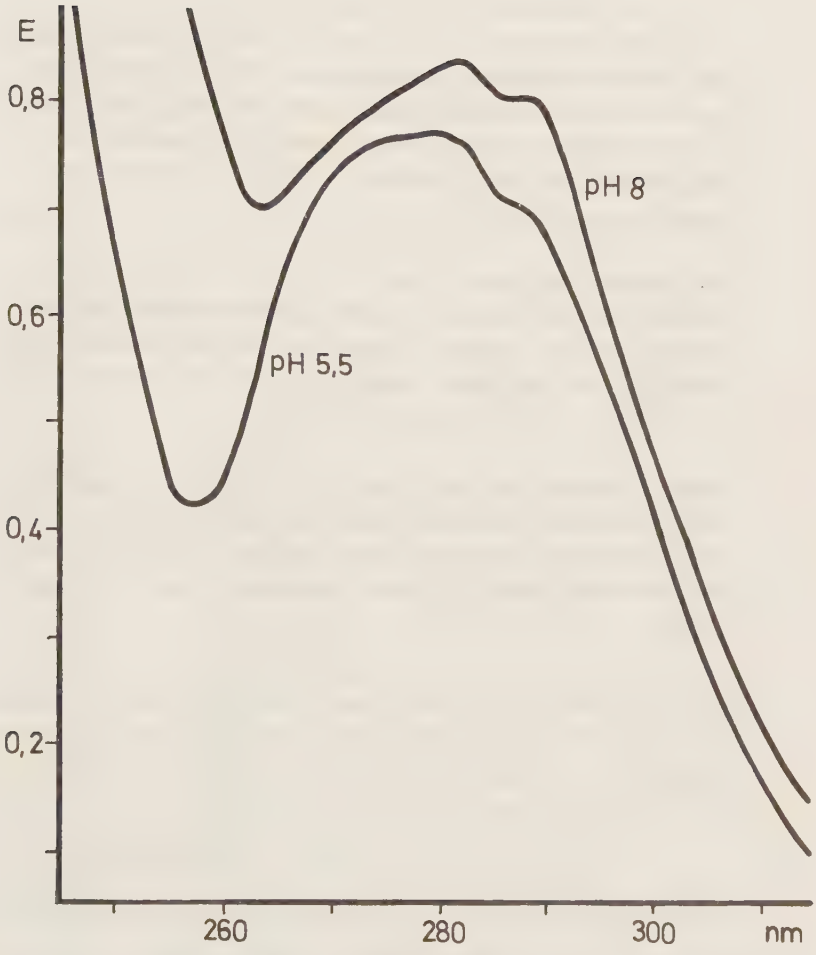

Abb. 12: Lichtabsorptionsspektrum des Corticotropin (1-20) - eicosapeptids in H_2O, gemessen mit einem Zeiss PMQ II Spektrometer, Schichtdicke 1 cm

II. Mit Fluorwasserstoff

Das mit wasserfreiem Fluorwasserstoff abgespaltene Peptid wurde mitsamt dem Harz getrocknet (Herrn Dr. E.Schnabel vom Pharm.Wiss. Hauptlabor der Farbenfabriken Bayer AG., Wuppertal-Elberfeld danke ich hierfür recht herzlich).

Das Peptid wurde aus dem Harz durch mehrmaliges Behandeln mit Trifluoressigsäure und Methanol herausgelöst und aus dieser Lösung nach Einengen mit Äther gefällt. Das ausgefallene Produkt wurde abzentrifugiert und mit Äther gewaschen.

Dieses äußerst hygroskopische Produkt löste man in wenig wässriger Essigsäure unter Methanol-Zusatz. Die Reinigung erfolgte über eine Sephadex G 25 - Chromatographiersäule mit 15 %iger Essigsäure als Elutionsmittel.

Ser	Glu	Pro	Gly	Val	Met	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	
2,0	1,0	1,8	2,4	2,1	0,8	1,0	0,9	2,4	0,8	1,1	: 1
2,0	1,4	2,6	2,4	2,2	0,7	0,9	0,8	3,6	0,5	1,0	: 2
2,2	1,0	2,4	2,1	2,1	1,0	0,9	0,9	2,4	0,4	1,8	: 3
2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	: 4

Tabelle 4: Werte der Aminosäureanalyse des synthetisierten ACTH (1-20)-eicosapeptids
1: am Harz
2: HF-Abspaltung
3: HBr-Abspaltung
4: Theoretisch

Man erhielt 2 Peaks die nach der Aminosäureanalyse nicht unterscheidbar waren. Beide Peaks wurden vereinigt, gefriergetrocknet, in wenig 15 %iger Essigsäure und Methanol gelöst und erneut über Sephadex G - 25 chromatographiert.

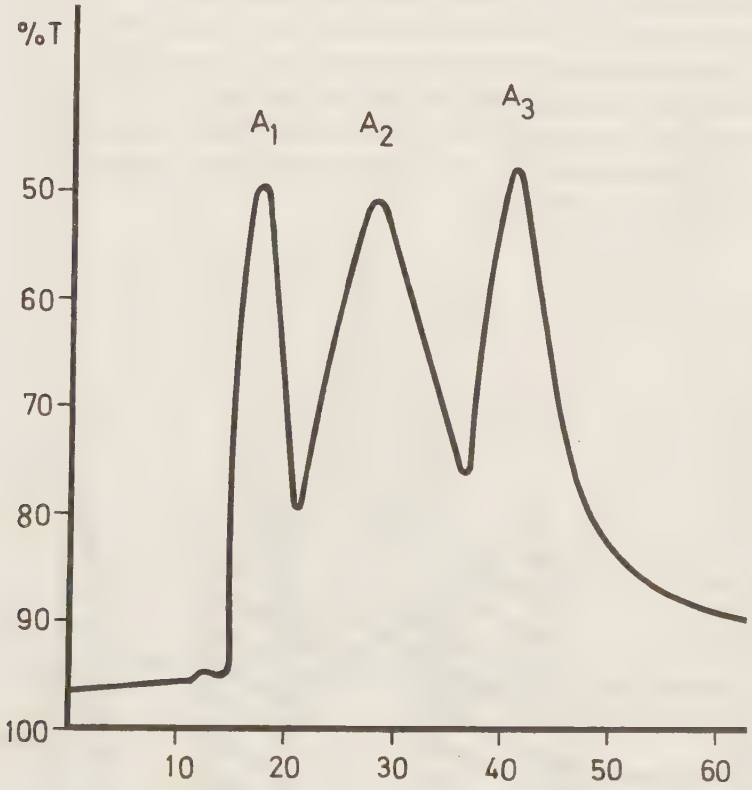

Abb. 13: Elutionsdiagramm vonACTH 1-20 an CM-Cellulose mit KCl-Gradient (H_2O/ 1 m-KCl)
Die Transmission (T) wurde bei 254 nm mittels Uvicord registriert. Das Eluat wurde in 50 Tropfen-Fraktionen aufgefangen.

Im Sayers-Test ergab sich eine ACTH-Aktivität von 3 I.E. / mg. Nach Gefriertrocknung wurde das Produkt mit 10 %igem wässrigem Methanol digeriert und über eine Ultrazentrifuge bei 15 000 U/min zentrifugiert. Das klare Zentrifugat wurde über eine Säule mit Carboxymethylcellulose mit einem KCl-Gradienten eluiert. Man erhielt 3 ineinanderübergehende Peaks. Nach Gefriertrocknung der 3 Fraktionen wurde über eine Sephadex G - 25 Säule mit Wasser eluiert. Dabei trennten die ursprünglichen 3 Fraktionen in insgesamt 9 Teilfraktionen auf. Ihr Elutionsdiagramm zeigen die Abbildungen 14 - 16.

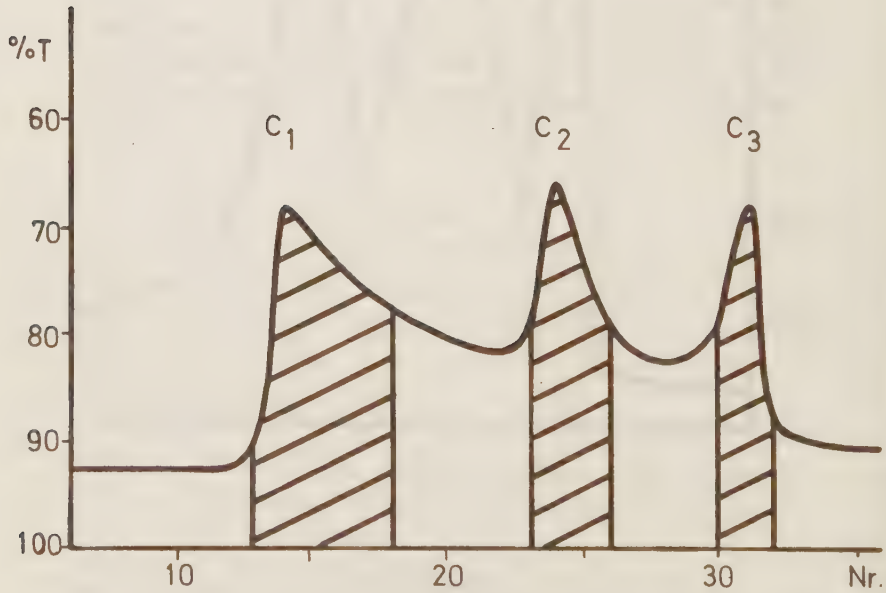

Abb.14: Chromatogramm von A_1 an Sephadex G 25
(25 x 2,5 cm)
Elutionsmittel: H_2O

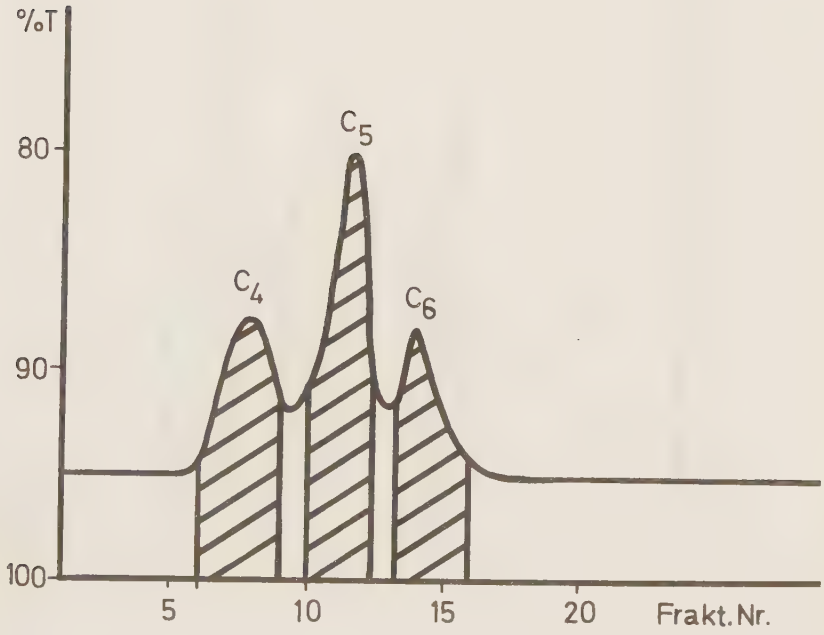

Abb.15: Chromatogramm von A_2 an Sephadex G 25
Elutionsmittel: H_2O

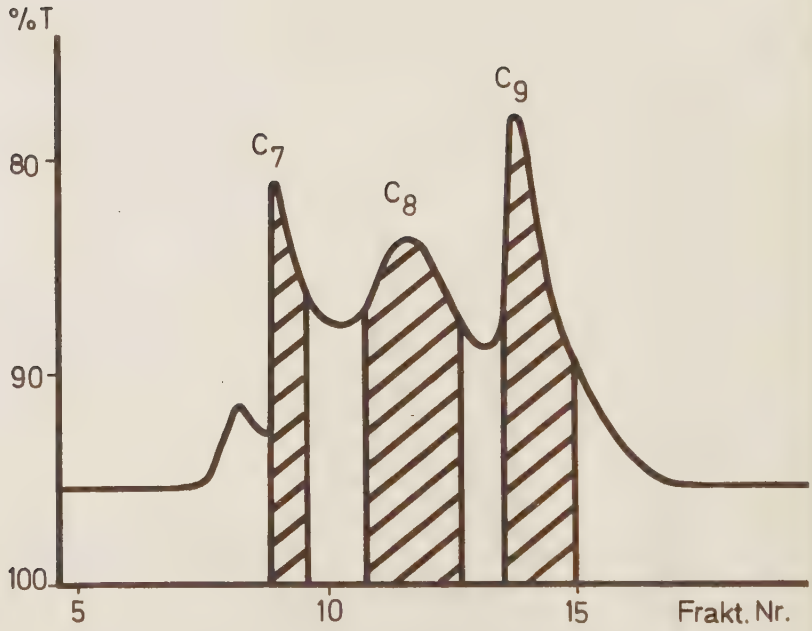

Abb.16: Chromatogramm von A_3 an Sephadex G 25
Elutionsmittel: H_2O

6. Synthese der ACTH-Sequenz 14 - 20

Da es bei beiden Synthesen nicht gelungen war, ein einheitliches und dem natürlichen ACTH völlig vergleichbares biologisch-aktives Peptid zu synthetisieren, erschien es wahrscheinlich, daß die Synthese der Teilsequenz 14 - 20 Schwierigkeiten macht. Teilsequenz 14 - 20 enthält 4 basische Aminosäuren und in Nachbarschaft zur Kupplung sterisch ungünstige Aminosäuren:

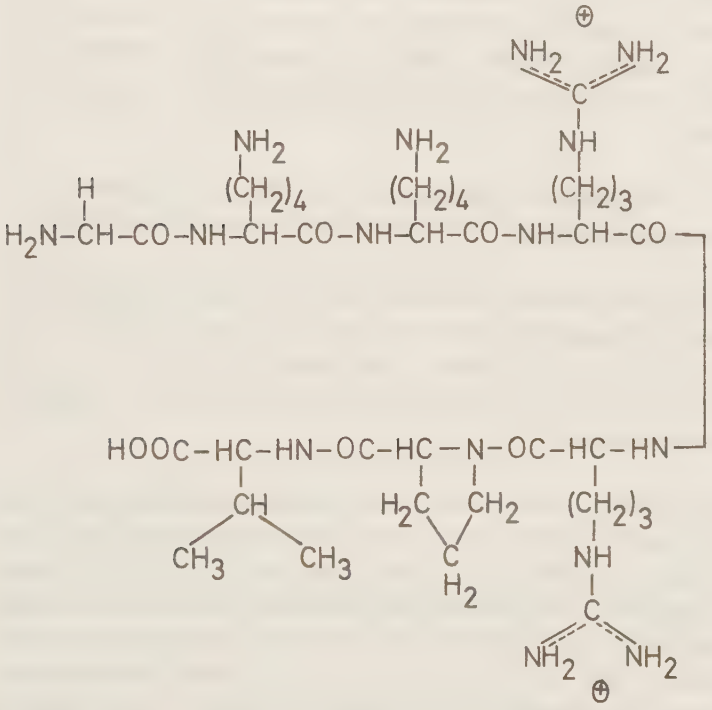

Abb.17: Sequenz des ACTH-Teilstücks 14 - 20

Aus diesem Grunde wurde zum Modellstudium diese Teilsequenz aufgebaut. Die Verknüpfung der ersten Aminosäure erfolgte durch 60 Stunden Rückflußkochen in Äthanol mittels Triäthylamin. Nach Waschen mit Äthylacetat wurden die nicht veresterten Chlormethylgruppen des Harzes mit einer 30 %igen Lösung von Triäthylamin in Äthylacetat unter Zusatz von 62 mMol Acetanhydrid 5 Stunden bei 90° C umgesetzt. Das gebildete Chlorid wurde nach Auswaschen mit Triäthylamin wie üblich titriert. Es ergab sich ein Gehalt von 0,21 mMol pro Gramm Harz. Anschließend wurde weitere 15 Minuten mit einer 10 %igen Lösung von Triäthylamin in Dimethylformamid geschüttelt. Nach Auswaschen mit Dimethylformamid und Äthanol ergab sich ein Gehalt von 0,012 mMol Chlorid pro Gramm Harz.

Die Beladung des Harzes wurde nach Hydrolyse und Aminosäureanalyse zu 0,33 mMol / g Harz bestimmt.

Nach Acetylierung und Waschen mit Triäthylamin/Dimethylformamid verbleiben somit 0,4 mMol Chlormethylgruppen pro Gramm Harz (Harz-Kapazität 1,03 mMol / g), d.h. etwa 60 % der vorhandenen Chlormethylgruppen haben reagiert.

Zur Synthese wurden die folgenden Aminosäurederivate eingesetzt: BOC - Val - OH, BOC - Pro - OH, BOC - Arg (BOC) - OH, BOC - Lys (Z) - OH, BOC - Gly - OH. Die Abspaltung der BOC-Gruppe erfolgte durch 40-minütiges Behandeln mit 1 N-Chlorwasserstoff in Eisessig. Die Neutralisation wurde mit einer 10 %igen Triäthylamin-Lösung in Dimethylformamid durchgeführt. Das Ankuppeln der nächsten Aminosäure erfolgte durch zweimaligen Umsatz der am Harz verknüpften Aminokomponente mit einem äquivalenten Überschuß von BOC-Aminosäure und DCCI, der

von 5-fach zu Beginn auf 10-fach gegen Ende der Synthese anstieg. Nach jeder Kupplung wurden die nicht umgesetzten freien Aminogruppen der Aminokomponente durch Reaktion mit Acetanhydrid blockiert, um die Bildung von Fehlsequenzen zu vermeiden. Das gebildete Chlorid wurde anschließend titriert. Über die erhaltenen Werte und die gewählten Reaktionszeiten gibt Tabelle 5 Auskunft.

	Val 20	Pro 19	Arg 18	Arg 17	Lys 16	Lys 15	Gly 14
mMol Cl^- nach Neutr.	1,92	1,82	1,68	1,33	0,80	0,79	-
$\%NH_2$-Funkt.	100	94,8	87,5	69,4	41,6	41,1	-
Reaktionszeit mit DCCI (Stunden)	-	2x3	2x48	2x48	2x12	2x3	2x3
mMol Cl^- nach Acetyl.	0,91	0,48	0,41	0,42	0,48	0,43	0,40

Tabelle 5: Synthese der ACTH-Sequenz 14-20

Das so synthetisierte Peptid BOC-Glycyl- -Carbobenzoxy-Lysyl- -Carbobenzoxy-Lysyl-Arginyl-Arginyl-Prolyl-Valin wurde durch Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure abgespalten. Nach Einengen im Vakuum wurde das Produkt mit Äther gefällt. Die Aminosäureanalyse ergab:

gef. Val 1,3 Pro 1,0 Arg 1,1 Lys 1,2 Gly 0,8
theor. Val 1 Pro 1 Arg 2 Lys 2 Gly 1

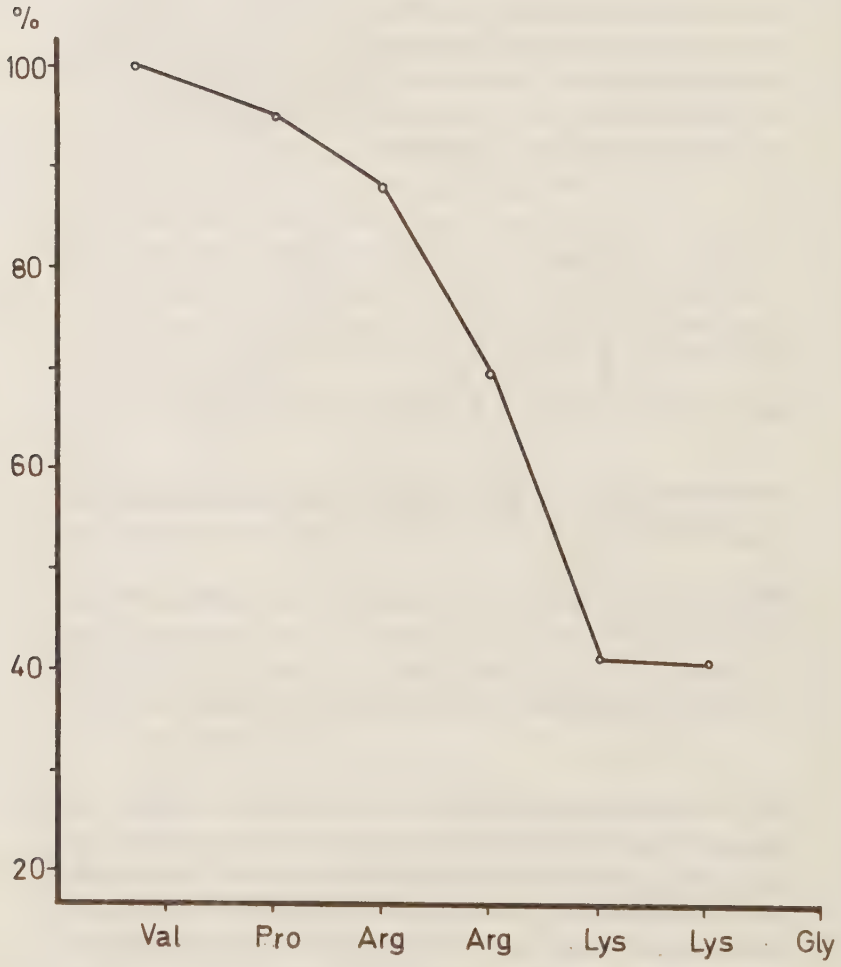

Abb.:18 Abnahme freier Aminofunktion während der Synthese.

Nach Lösen in 2 ml bidestilliertem Wasser wurde auf eine 2,5 x 25 cm Säule mit Carboxymethyl-Cellulose aufgetragen. Das Rohpeptid wurde mit einem KCl-Gradienten eluiert. Das Eluat wurde mittels eines automatischen Fraktionssammlers mit Uvicord in 60 Tropfen-Fraktionen aufgefangen. Die erhaltenen 6 Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert. Entsalzung erfolgte über eine 2,5 x 25 cm Säule mit Sephadex G-25. Dabei trat eine weitere Aufspaltung der 6 Fraktionen ein.

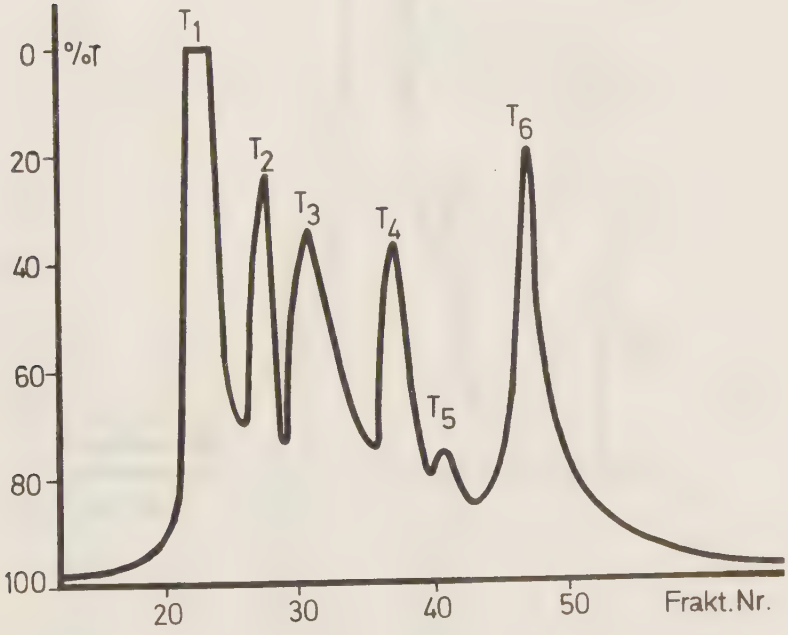

Abb.19: Chromatographie des Peptids 14-20 an CM-Cellulose.

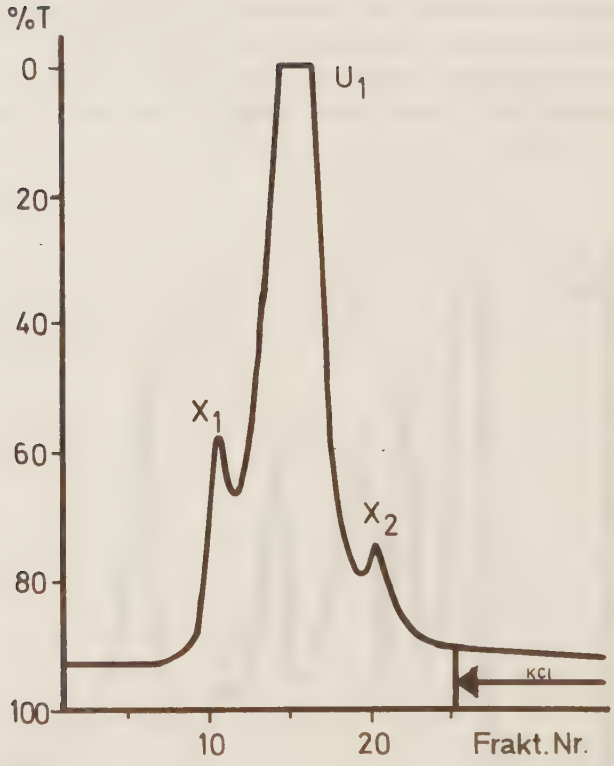

Abb.20: Entsalzung von T_1 an Sephadex G-25

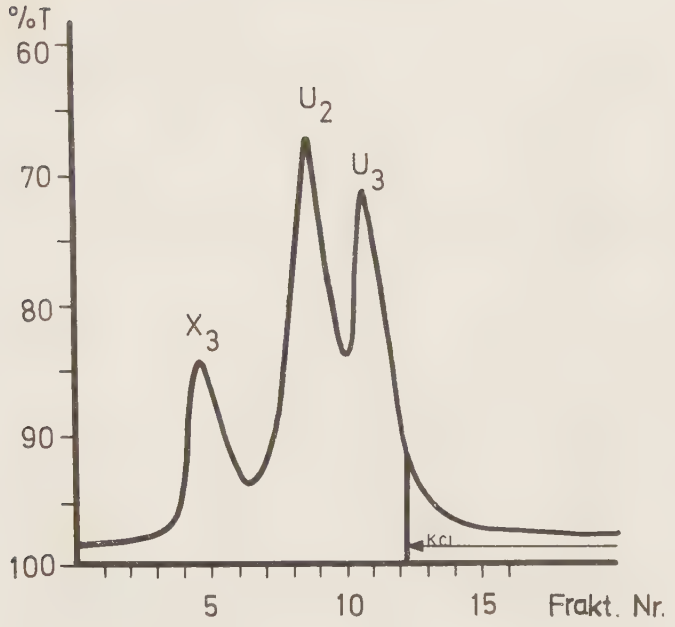

Abb.21: Entsalzung von T_2 und T_3 an Sephadex G-25

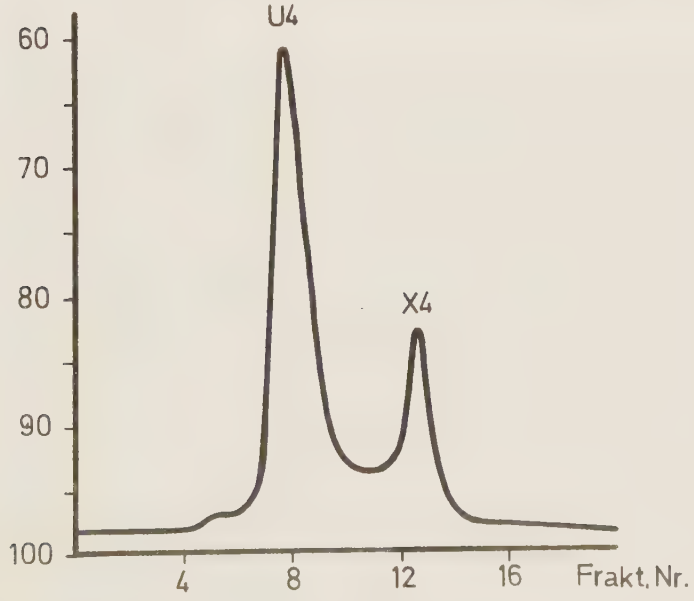

Abb.22: Entsalzung von T_4 an Sephadex G-25

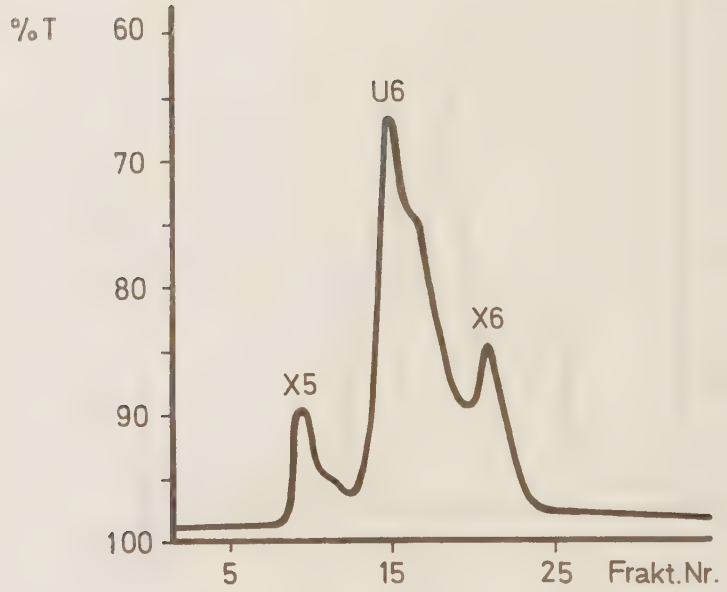

Abb.23: Entsalzung von T_6 an Sephadex G-25

Die Aminosäureanalyse der einzelnen Fraktionen zeigte, daß bis auf X_6 alle zusätzlich aufgetretenen Peaks keine Ninhydrin-positiven Reaktionen ergaben. Tabelle 6 gibt die erhaltenen Resultate der Aminosäureanalyse wieder:

	U_1	U_2	U_3	U_4	T_5	U_6	X_6	Theor.
Lys	2,0	2,2	-	2,0	-	-	-	2
Arg	0,7	Spur	-	Spur	-	-	-	2
Pro	1,0	-	-	0,2	-	1,0	-	1
Gly	-	0,8	-	0,3	-	-	-	1
Val	1,3	1,0	-	0,5	-	1,0	1,0	1

Tabelle 6: Aminosäurereste pro Mal isoliertes Peptid

Daraus kann man auf folgende Peptide schließen:

Theor.	: H -	Gly -	Lys -	Lys -	Arg -	Arg -	Pro -	Val -	OH
U_1	: H -	--- -	Lys -	Lys -	--- -	Arg -	Pro -	Val -	OH
U_2	: H -	Gly -	Lys -	Lys -	--- -	--- -	--- -	Val -	OH
U_4	: H -	Gly -	Lys -	Lys -	--- -	--- -	Pro -	Val -	OH
U_6	:					H -	Pro -	Val -	OH
X_6	:						H -	Val -	OH

U_4 scheint jedoch noch keine reine Fraktion zu sein.

An Hand der Analysen zeigt sich somit, daß trotz Acetylierung Fehlersequenzen entstanden sind. Das gewünschte Heptapeptid scheint in so geringer Ausbeute entstanden zu sein, daß es von der grossen Menge an Fehlpeptiden mit der Flüssigkeitschromatographie an CM-Cellulose und Sephadex G-25 nicht abgetrennt werden konnte. Weiterhin deutet das Auftreten einer ganzen Reihe von Ninhydrin-negativen Peaks auf Nebenreaktionen hin. Diese können insbesondere beim Arginin auftreten: So kann sich bei der Kupplungsstufe mit DCCI das Lactam bilden. Das würde bedeuten, daß das zur Kupplung eingesetzte BOC - Arg (BOC) - OH zu einem Teil mit DCCI unter Wasserabspaltung zum Lactam reagiert und zur Kupplung nicht voll zur Verfügung steht. Da die Lactame säurelabil sind, wird das gebildete, schwerlösliche Lactam (52) bei der Behandlung mit HCl/Eisessig wieder ausgewaschen. Dadurch kann der zu geringe Arginin-Gehalt der eluierten Peptide erklärt werden. Da Fehlerpeptide auftreten, scheint der 3 - 6-fache Überschuß von Acetanhydrid bei der Acetylierung der noch freien Aminogruppen nicht ausreichend gewesen zu sein.

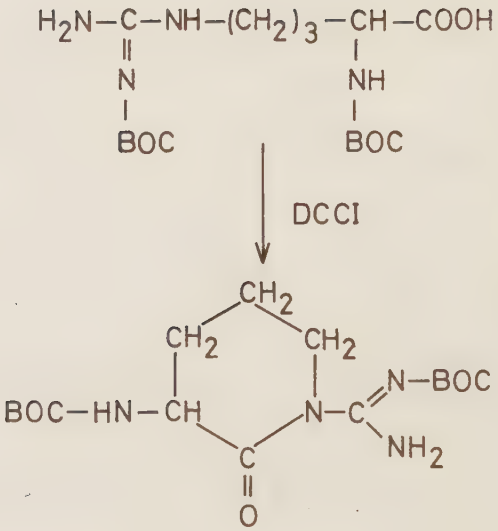

Abb.24: Lactambildung beim Di-BOC-Arg-OH

7. Synthese von Antamanid

Antamanid ist ein aus dem grünen Knollenblätterpilz (Amanita phalloides) isoliertes cyclisches Dekapeptid (53), dessen rechtzeitige Applikation bei der weißen Maus die tödliche Wirkung der Phallotoxine und Amatoxine aufzuheben vermag (54). Seine Struktur wurde von Wieland und Mitarbeitern (55) durch Cyclisierung der nach klassischen Methoden synthetisierten Dekapeptide H - Phe - Phe - Val - Pro - Pro - Ala - Phe - Phe - Pro - Pro - OH und H - Phe - Pro - Phe - Phe - Val - Pro - Pro - Ala - Phe - OH bewiesen.

Es wurde nun versucht, das Linearpeptid H - Phe - Pro - Pro - Phe - Phe - Val - Pro - Pro - Ala - Phe - OH nach der Merrifield-Methode zu synthetisieren. Hierfür wurde ein Harz der Kapazität 1,8 meq/g verwendet. Die Beladung nach 40-stündiger Veresterung mit BOC - Phe - OH wurde nach Abspaltung der BOC - Schutzgruppe mit HCl/Eisessig und Titration des Triäthylamin-Hydrochlorids nach dem Neutralisationsschritt zu 0,36 mMol/g Harz bestimmt. Ferner wurden folgende N-geschützten Aminosäuren eingesetzt:

BOC - Ala - OH, BOC - Pro - OH, BOC - Val - OH und BOC - Phe - OH. Die Knüpfung der Peptidbindung erfolgte mit DCCI, wobei ein 5-facher Überschuß an DCCI und BOC-Aminosäure verwendet wurde.

Die Abspaltung des Dekapeptids vom Träger erfolgte durch Suspendierung des Harzes in Trifluoressigsäure und Durchleiten von Bromwasserstoff für 90 Minuten Dauer. Das Peptid wurde dann mit Äther gefällt. Man erhielt ca. 70 % der erwarteten Menge.

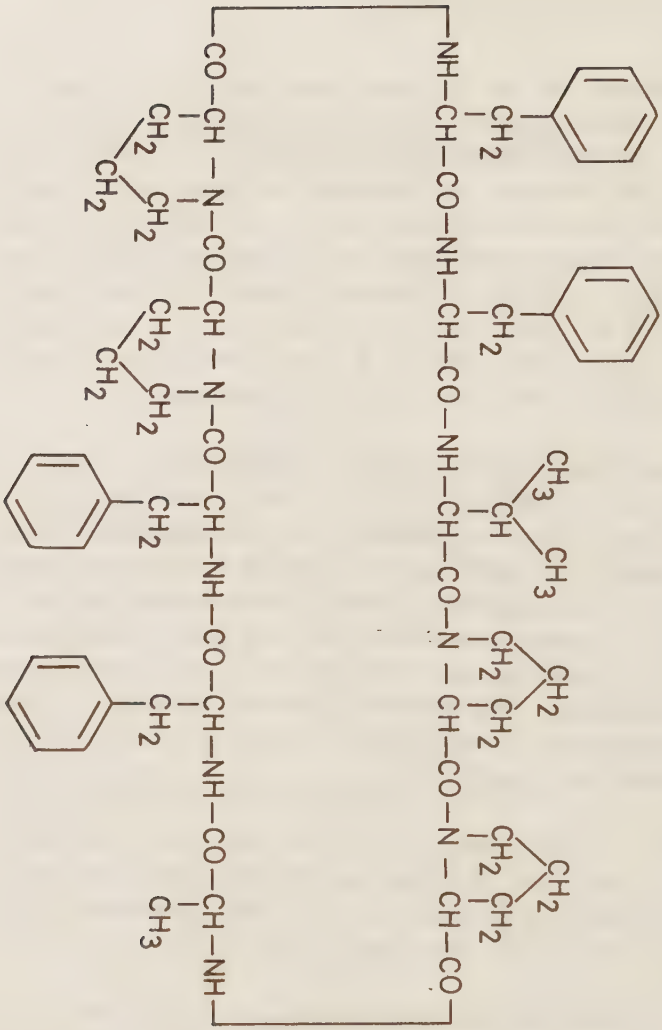

Abb.25: Struktur des Antamanids

Das Peptid verhielt sich dünnschichtchromatographisch mit verschiedenen Laufmitteln einheitlich.

Die Cyclisierung erfolgte nach Boissonas und Schumann (56); es wurde jedoch ein 10-facher Überschuß von Chlorameisensäureäthylester eingesetzt.

Antamanid ist massenspektrometrisch charakterisiert durch ein intensives Molekülion bei m/e = 1146 (57). Dieses Molekülion m/e = 1146 konnte im Cyclisierungsprodukt eindeutig bestimmt werden. Die Cyclisierung selbst verlief jedoch mit nur 5 % Ausbeute.

Die Aminosäureanalyse mit 12 N-HCl/Essigsäure = 1 : 1 ergab in guter Übereinstimmung:

gef.	Pro 4,0	Val 0,95	Ala 1,0	Phe 4,0
theor.	Pro 4	Val 1	Ala 1	Phe 4

8. Diskussion

An Hand der Ergebnisse der Synthese verschiedener ACTH-Sequenzen und des Linearpeptids von Antamanid wurden folgende Punkte deutlich:

a) Die Synthese komplizierter Sequenzen nach der Merrifield-Methode ist nicht einfacher als die Synthese nach klassischen Methoden et vice versa. W. Rittel (52) verzeichnet bei der klassischen Synthese der ACTH-Sequenz 15 - 19 ebenfalls sehr schlechte Ausbeuten. Das Pentapeptid H - Lys - Lys - Arg (NO_2) - Arg (NO_2) - Pro - OH erhielt dieser Autor in nur 10,7 % Ausbeute, obwohl nur 3 Kupplungsstufen mit DCCl durchgeführt wurden.

b) Die Acetylierung nicht umgesetzter NH_2-Gruppen der Aminokomponente war nicht vollständig, wie das Auftreten von Fehlersequenzen zeigte. Hier könnte statt der räumlich kleinen aber weniger reaktionsfreudigen Acetylgruppe, die von Th.Wieland (58) eingeführte p-Nitrophthalyl-Gruppe als Blocker bessere Ergebnisse liefern. Ihre größere Raumbeanspruchung wiegt die durch die Nitro-Gruppe verbesserte Reaktionsfähigkeit jedoch kaum auf.

c) Es konnten während der gesamten Synthese bei der Acetylierung Chlorid-Ionen nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß dieses in vorherigen Waschvorgängen nicht ausgewaschen werden konnte. Durch die Vernetzung des Harzes ist gegenüber jedem Lösungsmittel ein unterschiedliches Quellvermögen bedingt. Dadurch können Hohlräume gebildet werden, die Lösungsmittelmoleküle einschließen. Auch kann in diesen Hohlräumen keine Kupplung stattfinden. Die dadurch zwangsläufig unvollständige Kupplung und Acetylierung führt zu Fehlerpeptiden.

d) Bei der Kupplung von Arginin an Arginin und von Lysin an Arginin wurden überdurchschnittlich schlechte Ausbeuten erzielt. Es wäre ratsam, derartig schwierige Sequenzen nach einer klassischen Synthese eventuell mit der Fragmenttechnik zu kuppeln und die Festkörpermethode bei leichter zugänglichen Teilsequenzen zu verwenden.

e) Die große Zahl an Nebenprodukten spricht gegen eine Anwendung von BOC - Arg (BOC)- OH. Die raumfüllenden BOC - Gruppen vermindern die Kupplungsausbeuten infolge sterischer Hinderung. Auch scheinen Nebenreaktionen an der Guanidino-Gruppe stattgefunden zu haben, d.h. ω-protonisiertes Arginin ist unter den Bedingungen der Merrifield-Synthese vermutlich nicht stabil genug.

Wie jedoch durch die Antamanid-Synthese bewiesen wurde, führt die Festkörpermethode bei weniger komplizierten Peptiden in hoher Ausbeute zu dem gewünschten Produkt, Auch Cystein enthaltende Peptide, wie das von H. Hagenmaier synthetisierte Nonapeptid Oxytocin, sind in guter Ausbeute und Reinheit erhältlich (17,59), wie ihre gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchung ergab (30,60).

C. Experimenteller Teil

1. Darstellung der Tert.-Butyloxycarbonyl-Aminosäuren

Die BOC-Aminosäuren wurden nach der von E.Schnabel (63) durch pH-Stat-Reaktion verbesserten Schwyzer'schen BOC-Azid Technik (64) hergestellt.

Aminosäure-derivat	pH-Wert	Zeit (Std.)	Ausbeute (%)	Fp. (exp.)	Fp. (Lit.)
Ala	11,0	5,5	79	80-82	80-82
Arg(NO_2)	9,8	26	66	124-126	123-125
Asp(OBzl)	9,0	20	71	99-101	99
Glu(OBzl)	9,1	18	58	sirup.	sirup.
Gln	10,2	16			116-118
Gly	10,0	3	83	88-89	90-94
Leu	10,3	5	85	77-80	78-81
Lys(Z)	10,2	5	90	sirup.	sirup.
Met	9,8	6	88	sirup.	sirup.
Phe	10,4	10	83	85	84-86
Pro	9,1	2,5	75	135-136	134-136
Ser(OBzl)	10,2	20	77	59-61	59
Tyr(OBzl)	10,3	14	76	109	108-110
Try	10,0	10	68	136-138	135-137
Val	9,8	4	66	72	72-73

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen zur Darstellung der BOC-Aminosäuren

... in der ... die angegebenen Literatur-Schmelzpunkte (n.Lit.) wurden (63) (66) und (67) entnommen. Die erhaltenen BOC-Aminosäuren wurden dünnschichtchromatographisch auf ihre Reinheit geprüft. Auch wurden zusätzliche Kriterien wie Drehwertmessungen, Elementaranalysen und Kernresonanzspektroskopie angewandt.

a) Darstellung von BOC-Gly-OH

Als charakteristisches Beispiel für die nach der pH-Stat-Methode hergestellten BOC-Aminosäuren sei die Vorschrift für BOC-Gly-OH (67) beschrieben.

35 g(0,47 Mol) Glycin wurden in 160 ml Dioxan/Wasser = 1 : 1 durch starkes Rühren aufgeschlämmt und mit 77 g (0,5 Mol) frisch destilliertem BOC-Azid versetzt. Nun wurde am Autotitrator bei pH 10 mit 4N-Natronlauge titriert. Nach 3 Stunden war die Lösung klar geworden und verbrauchte keine Natronlauge mehr. Nach Extraktion mit 150 ml Äther wurde die wässrige Phase mit Kochsalz gesättigt. Unter Eiskühlung säuerte man mit konzentrierter Salzsäure bis pH 1,8 an. Dann folgte dreimalige Extraktion mit Essigester. Die vereinigten Extrakte wurden zweimal mit je 150 ml NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, bei einer Badtemperatur von 40-50° C, wurde das zurückgebliebene Öl in Methyläthylketon gelöst und durch Zugabe von Petroläther kristallisiert.
Ausbeute: 69 g = 83 % d.Th.

b) Darstellung von BOC-Arg(BOC)- OH

Die Darstellung erfolgte nach der pH-Methode bei pH 12 aus 174 g (1Mol) Arginin und 315 g (2,1Mol) BOC-Azid im Dioxan/Wasser-Gemisch. Nach 72 Stunden wurde

mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde unter Eiskühlung mit halbkonzentrierter Salzsäure bis pH 2 angesäuert. Das ausgefallene Öl wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch fünfmal mit Chloroform extrahiert. Das Öl wurde in siedendem Chloroform gelöst und mit den Extrakten vereinigt. Nach Behandeln mit Na_2SO_4 und Tierkohle wurde das BOC-Arg(BOC)- OH durch Zugabe von Äther gefällt.

Dünnschichtchromatographisch waren Spuren der Mono - und Tri-BOC-Derivate nachweisbar, jedoch sollten diese bei der Peptidsynthese nicht stören.

Die Elementaranalyse ergab

theor.	C 51,32	H 8,07	N 14,95
gef.	C 50,98	H 8,20	N 14,88

c) Darstellung von BOC-His-OH

Die Synthese erfolgte nach 2 Methoden:

I. Nach Schwyzer et.al. (68):

Zu 62 g (0,4 Mol) Histidin in einer Lösung von 800 ml Dioxan und 200 ml 2N-Natronlauge wurden 65 ml (0,45Mol) BOC-Azid und 440 ml 1N-Natronlauge zugetropft. Danach wurde 60 Stunden gerührt; der pH lag dann bei 8,5. Das Dioxan wurde im Vakuum entfernt, die verbliebene Lösung mit verdünnter Schwefelsäure zwischen 0 und -3° C bis pH 4 angesäuert. Nun wurde mit Butanol mehrmals extrahiert. Nach Abziehen des Butanols wurde das zurückgebliebene Öl in Äthanol aufgenommen und getrocknet. Das BOC-His-OH wurde durch Zugabe von Äther gefällt. Dreimaliges Umfällen ergab 45 g BOC-His-OH = 44 % d.Th.

Das Produkt weist dünnschichtchromatographisch kein His-OH mehr auf. Da es hygroskopisch ist, wurde es im Exsikkator über P_2O_5 aufbewahrt.

II. Aus BOC-His(Bzl)- OH:

Die Darstellung gelingt auch durch Abspaltung der N(Im)-Bzl-Gruppe von BOC-His(Bzl)- OH, welches nach (40,63) erhalten wurde.

16,5 g(0,05 Mol) BOC-His(Bzl)- OH wurden in 500 ml flüssigem Ammoniak gelöst. Durch Zugabe kleiner Natriumstückchen wurde die N(Im)- Bzl-Gruppe abgespalten. Die Blaufärbung am Schluß der Reaktion wurde 30 Minuten belassen, dann wurde mit Ammoniumacetat zersetzt. Das Ammoniak wurde im Wasserstrahlvakuum abgezogen, der Rückstand in Eisessig aufgenommen und gefriergetrocknet. Das erhaltene Pulver kristallisierte man mehrere Male aus Äthanol/Äther um. Sein dünnschichtchromatographisches Verhalten entspricht dem unter I. hergestellten Produkt.
R_f = 0,25 (Butanol/Eisessig/Wasser = 65/10/25).

d) Darstellung von BOC-Glycin-p-Nitrophenylester

35 g (0,2 Mol) BOC-Gly-OH und 36,3 g p-Nitrophenol (0,26 Mol) wurden in Essigester auf -5° C gekühlt. Dann wurde eine Lösung von 41,5 g (0,2 Mol) DCCl in Essigester zugesetzt. Man rührte 30 Minuten und ließ dann eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Nach Abnutschen des gebildeten Dicyclohexylharnstoffs wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Äther gelöst und durch Zugabe von Petroläther kristallisiert.
Ausbeute: 49 g = 83 % d.Th.
Fp. 68 - 69° C Lit. 68° C (66,67)

2. Darstellung des Dodekapeptids H-Ala-Phe-(Ala-Phe)$_4$ - Ala-Phe-OH

a) Veresterung von BOC-Phe-OH mit dem Harz

5 g chlormethyliertes Harz (BIO-Rad,New York) der Kapazität 1,8 meq/g in 50 ml absolutem Äthanol wurden mit 1,05 g (4,5mMol) BOC-Phe-OH und 0,33 ml (4,5mMol) Triäthylamin 48 Stunden bei 80° C gerührt. Anschließend wurde das Harz mit Äthanol, DMF und Methylenchlorid gewaschen.

b) Aufbau der Peptidkette

Nach Überführung in das Reaktionsgefäß (66), wurde das mit BOC-Phe-OH veresterte Harz folgendem Reaktionszyklus unterworfen:

1. Waschen mit 3 x 30 ml Eisessig
2. 30 Minuten mit 30 ml 1N-HCl / Eisessig schütteln
3. Waschen mit 3 x 30 ml Eisessig
4. Waschen mit 3 x 30 ml Äthanol
5. Waschen mit 3 x 30 ml DMF
6. 10 Minuten mit 30 ml einer 10 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF schütteln
7. Waschen mit 3 x 30 ml DMF
8. Titration der Chlorid-Ionen nach Volhard
9. Waschen mit 3 x 30 ml Methylenchlorid
10. Ankuppeln der nächsten BOC-Aminosäure:
    8 mMol BOC-Aminosäure)
    8 mMol DCCI) in 20 ml CH_2Cl_2
)
    Dauer der Reaktion: 2 Stunden
11. Waschen mit 3 x 30 ml Methylenchlorid
12. Waschen mit 3 x 30 ml DMF
13. Waschen mit 3 x 30 ml Äthanol

Alle Aminosäuren wurden auf die gleiche Weise angekuppelt. Die Titration der Chlorid-Ionen ergab 1,68 mMol, d.h. es waren 0,34 mMol Phenylalanin pro Gramm Harz verestert. Dieser Wert blieb während der ganzen Synthese konstant.

c) Abspaltung des Peptids vom Harz

Nach dem letzten Reaktionszyklus (BOC-Ala-OH) wurde das Harz in 50 ml Trifluoressigsäure suspendiert. Unter Rühren leitete man 90 Minuten lang einen Bromwasserstoffstrom durch diese Lösung. Das Harz wurde abfiltriert und mehrere Male mit Trifluoressigsäure ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum bis auf ca. 1 ml eingeengt und das Peptid mit Äther gefällt.
Ausbeute: 2,1 g (1,48 mMol) = 88 % d.Th.

Hydrolyse einer Probe mit 2 ml 6N-HCl im Bombenrohr bei 110° C für 96 Stunden und Aminosäureanalyse mit einem Beckman Unichrom Aminosäureanlysator ergab ein Verhältnis Ala : Phe = 1,0 : 0,94. Nach der Analyse waren nur 78 % des Dodekapeptids tatsächlich hydrolysiert worden.

Neben der schlechten Hydrolysierbarkeit ist das Peptid charakterisiert durch seine schlechte Löslichkeit. Es ist nur in Trifluoressigsäure und Ameisensäure löslich.

Zur Bestimmung der Fehlersequenzen wurden 100 mg Peptid mit 5 ml konzentrierter Salzsäure in einem thermostatisierten Reaktionsgefäß 72 Stunden bei 37° C gerührt. Dabei war das Reaktionsgefäß abgedunkelt (69).

Die überschüssige Salzsäure wurde dann bei 20° C im Vakuum abgedampft. Die zurückgebliebenen Peptidhydrochloride wurden in 5 ml Methanol aufgenommen und durch Zugabe einiger Tropfen Wasser in Lösung gebracht. Dann tropfte man ätherische Diazomethan-Lösung bis zur gleichbleibenden Gelbfärbung der Reaktionslösung zu. Überschüssiges Diazomethan wurde durch Zugabe von ein bis zwei Tropfen Eisessig zerstört. Das Produkt wurde bei 20° C im Vakuum zur Trockene eingedampft.

Die erhaltenen Peptidmethylester wurden dann trifluoracetyliert (60,70): Nach Lösen der Peptidester in Methanol wurde die Lösung mit Triäthylamin auf pH 8 eingestellt. Dann wurden 2 ml Trifluoressigsäuremethylester zugegeben und das Reaktionsgemisch 8 Stunden stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum bis zur Trockene wurde der Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt. Die Essigesterphase wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand direkt mit dem Gas-Chromatograph-Massenspektrometer LKB 9000 untersucht.

3. Synthese von ACTH 1 – 39

a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz

4 g chlormethyliertes Harz der Kapazität 1,8 meq / g und 1,06 g (4 mMol) BOC-Phe-OH, gelöst in 50 ml Äthanol, wurden mit 0,56 ml (4,1 mMol) Triäthylamin versetzt und 24 Stunden bei 80° C am Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das Harz in die Schüttelente überführt und mehrere Male mit DMF und Äthanol gewaschen.

b) Aufbau der Peptidkette

1. Waschen mit 3 x 40 ml Eisessig
2. 40 Minuten mit 40 ml 1N-HCl / Eisessig schütteln
3. Waschen mit 3 x 40 ml Eisessig
4. Waschen mit 2 x 40 ml Äthanol
5. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
6. 10 Minuten mit 40 ml einer 10 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF schütteln
7. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
8. a) Waschen mit 3 x 40 ml Methylenchlorid
   b) Waschen mit 1 x 40 ml DMF
9. Titration der Chlorid-Ionen nach Volhard
10. Ankuppeln der nächsten BOC-Aminosäure:
    a) 10 mMol BOC-Aminosäure)) in 20 ml CH_2Cl_2
       10 mMol DCCl))
    b) 10 mMol BOC-Aminosäure-p-Nitrophenylester in 20 ml DMF

    Dauer der Reaktion: a) 3 Stunden
    b) 10 Stunden
11. a) Waschen mit 3 x 40 ml Methylenchlorid
    b) Waschen mit 3 x 40 ml DMF
12. Waschen mit 2 x 40 ml Äthanol
13. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
14. Waschen mit 2 x 40 ml Äthanol

Die Syntheseschritte 8b, 10b, 11b wurden bei den folgenden BOC-Aminosäuren-p-Nitrophenylestern angewandt:

BOC - Gln - ONP
BOC - Gly - ONP

Die Abspaltung der ersten BOC-Gruppe (phe) ergab 1,78 mMol Chlorid.

Ab Sequenz Nr. 5 wurden der HCl/Eisessig-Lösung je 2,5 g (21,3 mMol) Indol zugesetzt.

Nach beendeter Synthese wurde das Harz im Vakuum getrocknet. Man erhielt 7,17 g Peptid; das entspricht einer Gewichtszunahme von 3,17 g.

c) Alkalische Abspaltung

In 100 ml absolutem Äthanol wurden 600 mg (26 mMol) Natrium gelöst. Dazu wurden unter Rühren 2,42 g Peptid-Harz gegeben. Nach 5 Stunden wurde vom Harz abfiltriert und dieses für weitere 20 Stunden mit Natriumalkoholat behandelt. Die beiden Filtrate wurden tropfenweise mit 20 %iger Zitronensäure versetzt, bis ein Niederschlag auftrat. Dann wurde zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde zur Abspaltung der BOC-Gruppe in Trifluoressigsäure aufgenommen. Nach 20 Minuten wurde diese abgezogen und der Rückstand ohne weitere Reinigung in 50 ml Methanol und 15 ml Eisessig aufgenommen. Nach Zugabe von 5 ml BF_3O $(C_2H_5)_2$ wurde 4 Stunden hydriert. Als Katalysator wurde frischgefälltes Palladiumschwarz verwendet. Dann wurde der Katalysator erneuert und weitere 24 Stunden hydriert. Die so erhaltene Lösung wurde im Vakuum eingeengt und über eine 2,5 x 150 cm Säule mit Sephadex G-50 gereinigt. Elutionsmittel: Methanol : Wasser = 60 : 40. Die Fraktionen sammelte man mit einem automatischen Fraktionssammler mit Uvicord. Das Eluat wurde eingeengt und gefriergetrocknet. Das erhaltene Lyophilisat wurde in 5 ml Äthanol und 0,5 ml H_2O aufgenommen und mit Äther gefällt. Der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther zerrieben und getrocknet.
Ausbeute: 290,3 mg.

Der Test auf biologische Aktivität erfolgte nach Sayers (42) [2]: Dieser Test beruht auf einer Verminderung des Ascorbinsäuregehalts durch ACTH in der Nebenniere.

Bei männlichen Sprague-Dawley Ratten, die ein Körpergewicht zwischen 120 und 160 g aufwiesen, wurde die Hypophyse entfernt. 21 bis 27 Stunden danach wurden die Ratten mit Pentobarbital-Natrium anästhesiert. Die linke Nebenniere wurde entfernt und zur Analyse vorbereitet. Die zu prüfende Testlösung verabreichte man intravenös über eine Schwanzvene. Eine Stunde später wurde die rechte Nebenniere entfernt und ebenfalls analysenfertig gemacht. Die Nebennieren wurden sorgfältig vom anhaftendem Fettgewebe befreit; anschließend wurde auf Parafilm gewogen. Die Drüse wurde fein zermahlen und mit 12 ml Trichloressigsäure behandelt. Nach Zugabe von 300 mg Norit wurde zentrifugiert. Man machte nun Doppelbestimmungen mit aliquoten Volumina des Zentrifugats nach Roe und Kuether (71). Nach dieser Methode ist es möglich den totalen Ascorbinsäure-Gehalt zu bestimmen, da sowohl reduzierte als auch Dehydro-Ascorbinsäure erfaßt werden. Die Genauigkeit der Methodik kann dadurch getestet werden, daß man den Ascorbinsäure-Gehalt der beiden Nebennieren von unbehandelten Ratten miteinander vergleicht, denen zuvor ebenfalls wie den Test-Ratten die Hypophyse entfernt wurde.
Als Standard wird ein ACTH-Präparat mit bekannter ACTH-Aktivität verwendet.

[2] Den Herren Dr. R.Geiger und Dr. H.G.Schröder von den Farbwerken Hoechst AG., Frankfurt/M. danke ich für die Ausführung dieser Tests recht herzlich.

Die Einheit der ACTH-Aktivität ist folgendermaßen definiert:

1 I.E. = 0,88 mg des Int.Standardpräparates nach Bull.World Health Org. 14,543 (1956)
= 1 mg Armour-Präparat La-1-A dargestellt nach Munson,Fed.Proc. 9,208 (1950)

Für das getestete Produkt erhielt man eine Aktivität von 3 I.E. / mg.
Im Vergleich hierzu weist natürliches ß-Corticotropin vom Schwein eine Aktivität von 100 - 200 I.E. / mg auf.

d) Abspaltung mit Bromwasserstoff

1,01 g Peptid-Harz wurden in 50 ml Trifluoressigsäure suspendiert. Nach Zugabe von 650 mg (5,5 mMol) Indol und 0,5 ml Methyläthylsulfid (5,5 mMol) wurde für 60 Minuten HBr durchgeleitet. Dann wurde vom Harz abgetrennt, dieses fünfmal mit je 20 ml Trifluoressigsäure gewaschen und das Filtrat bis auf ca. 2 ml eingeengt. Das Filtrat wurde auf Äther gegossen, das ausgefallene Produkt abfiltriert und mit Aceton/Äther gewaschen. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol gelöst und erneut mit Äther gefällt. Der Niederschlag wurde abgetrennt, in Wasser/Methanol = 1 : 1 gelöst und über eine 2 x 10 cm lange Säule mit Dowex 50, 100-200 mesh, gereinigt. Das Eluat wurde eingeengt und lyophilisiert.
Ausbeute: 291 mg Peptid.

I. Abspaltung der N(Im)- BZl-Schutzgruppe des Histidins

192 mg des lyophilisierten Produkts wurden in 200 ml flüssigem Ammoniak gelöst und eine Natriumlösung in

flüssigem Ammoniak zugetropft. Die stabile Blaufärbung am Ende der Reaktion wurde auf 60 Sekunden beschränkt. Das Ammoniak entfernte man im Wasserstrahlvakuum.

II. Reduktion der Nitro-Schutzgruppen der Arginyl-Reste

Der Rückstand wurde in 25 ml Eisessig gelöst und mit 330 mg (5 mMol) Zinkstaub eine Stunde bei 60° C reduziert. Nicht gelöstes Zink wurde abfiltriert und die Lösung gefriergetrocknet. Das Lyophilisat reinigte man über eine 2,5 x 150 cm Säule mit Sephadex G-50. Elutionsmittel: 10 %ige Essigsäure. Das Eluat wurde mit einem automatischen Fraktionssammler mit Uvicord in 100 Tropfen-Fraktionen aufgesammelt. Es ergaben sich zwei Peaks mit zusammen 121,8 mg Peptid = 63,7 % Ausbeute, bezogen auf eingesetztes, teilgeschütztes Peptid. Im Test nach Sayers ergaben sich 3 I.E. / mg.

e) Abspaltung mit Fluorwasserstoff

Die Abspaltung erfolgte nach Sakakibara (43 b) in einer Teflon-Apparatur mit wasserfreiem HF und Anisol. Das nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum erhaltene Peptid-Harz-Gemisch wurde mit Trifluoressigsäure digeriert. Das Peptid erhielt man durch Fällen mit Äther.

Dieses Peptid enthielt nur noch die N(Im)- Bzl-Schutzgruppe. Nach Eintragen in 200 ml flüssigen Ammoniak wurde eine Natriumlösung in flüssigem Ammoniak zugetropft. Die Blaufärbung am Ende der Reaktion beschränkte man auf 5 Minuten. Das Ammoniak wurde im Wasserstrahlvakuum abgezogen. Den Rückstand löste man in 4 ml Methanol/Essigsäure/Wasser = 2/1,5/1 und eluierte über

eine Sephadex G-25 Säule (2 x 100 cm) mit 10 %iger Essigsäure als Laufmittel. Man erhielt 88,6 mg Peptid, das im Sayers-Test 1 I.E. per mg ergab.

4. Synthese der ACTH-Sequenz 1 - 20

a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz

5 g Harz der Kapazität 1,03 meq / g wurden in 50 ml Äthanol mit 2,17 g (10 mMol) BOC-Val-OH und 1,4 ml (10 mMol) Triäthylamin für 48 Stunden bei 80° C gerührt.

b) Acetylierung der nicht veresterten Chlormethyl-Gruppen

Nach Auswaschen mit Äthanol wurde das Harz in das Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde mit 100 ml einer 4 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF und 5 ml (53 mMol) Acetanhydrid zwei Stunden lang geschüttelt. Das gebildete Chlorid wurde nach Volhard titriert. Es ergaben sich 0,8 mMol Chlorid, d.h. 0,16 mMol Chlormethyl-Gruppen pro Gramm Harz wurden acetyliert. Die Titration nach der ersten BOC-Abspaltung ergab 1,85 mMol Chlorid, d.h. 0,37 mMol BOC-Val-OH waren pro Gramm Harz verestert.

c) Aufbau der Peptidkette

Nach Waschen des Harzes mit 5 x 40 ml DMF und 2 x 40 ml Äthanol wurde es folgendem Reaktionszyklus unterworfen:

1. Waschen mit 3 x 40 ml Eisessig
2. 40 Minuten mit 40 ml 1N-HCl / Eisessig schütteln (ab Sequenz Nr. 9 mit Zusatz von 1 % Mercaptoäthanol und 2 % Methyläthylsulfid unter Stickstoff)

3. Waschen mit 3 x 40 ml Eisessig
4. Waschen mit 2 x 40 ml Äthanol
5. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
6. 10 Minuten mit 40 ml einer 10 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF schütteln
7. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
8. Waschen mit 3 x 40 ml Methylenchlorid
9. Titration der Chlorid-Ionen nach Volhard
10. Ankuppeln der nächsten BOC-Aminosäure:
    10 mMol BOC-Aminosäure) in 20 ml CH_2Cl_2
    10 mMol DCCI)
11. Waschen mit 3 x 40 ml Methylenchlorid
12. Wiederholung des Kupplungsschrittes:
    10 mMol BOC-Aminosäure) in 20 ml CH_2Cl_2
    10 mMol DCCI)
13. Waschen mit 3 x 40 ml Methylenchlorid
14. 30 Minuten mit 40 ml einer 4 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF und 3 ml Essigsäureanhydrid (31 mMol) schütteln
15. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
16. Titration der Chlorid-Ionen nach Volhard
17. Waschen mit 2 x 40 ml Äthanol

Zur Kupplung von BOC-Arg(BOC)- OH, BOC-Pro-OH und BOC-His-OH wurde soviel DMF zugesetzt bis die Aminosäure vollständig gelöst war. Bei Vorgang 11 und 13 wurde entsprechend verfahren.

d) Abspaltung des Peptids vom Harz

1. Mit Bromwasserstoff

1,50 g Peptid-Harz wurden in 50 ml Trifluoressigsäure suspendiert. Um den anwesenden Sauerstoff zu verdrängen, wurde 30 Minuten Stickstoff durchgeleitet. Nach Zugabe

von 4 ml (43 mMol) Mercaptoäthanol und 1 ml (11 mMol) Methyläthylsulfid wurde für 10 Minuten ein kräftiger Bromwasserstoffstrom und anschließend 30 Minuten lang Stickstoff durchgeleitet. Nach Abfiltrieren vom Harz fällte man das Peptid mit Äther.

Auswaage des getrockneten Produkts ergab 93,6 mg. Die Reinigung erfolgte über eine 2 x 100 cm Säule mit Sephadex G-25 superfine und Wasser/Methanol = 1 : 9 als Laufmittel. Das Produkt wurde mittels eines automatischen Fraktionssammlers mit Uvicord gesammelt. Nach Gefriertrocknung erhielt man 69,2 mg Peptid = 73,9 % bezogen auf eingesetztes Produkt.

Zur Tryptophanbestimmung wurden 12,2 mg Peptid mit 2 ml 6N-KOH im Bombenrohr bei 110° C 24 Stunden hydrolysiert. Der Tryptophan-Gehalt wurde nach Spies und Chambers (39) mit p-Dimethylaminobenzaldehyd nach Aufnahme einer Eichkurve zu 0,86 Mol per Mol Peptid bestimmt (theor. 1 Mol Try/Mol Peptid). Im Test nach Sayers ergab sich eine physiologische Aktivität von 2,5 I.E. / mg.

Im Vergleich dazu besitzt das Corticotropin (1-23) - trikosipeptid eine Aktivität von ca. 100 I.E. / mg. Das von Li et.al. (43 a und b) synthetisierte Corticotropin (1-19) - nonadekapeptid wies bei intravenöser Applikation eine Aktivität zwischen 29 und 34,6 I.E. / mg auf.

II. Mit Fluorwasserstoff

Das mit Fluorwasserstoff/Anisol abgespaltene Peptid wurde durch mehrmaliges Digerieren mit Trifluoressigsäure und Methanol aus dem Harz herausgelöst. Nach Einengen dieser Lösung fällte man das Peptid mit Äther.

Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags löste man das hygroskopische Produkt in 4 ml 15 %iger Essigsäure unter Zusatz einiger Tropfen Wasser. Dann wurde über Sephadex G-25 superfine chromatographiert (Elutionsmittel 15 %ige Essigsäure). Das Eluat wurde gefriergetrocknet und ein zweites Mal über Sephadex G-25 superfine chromatographiert. Nach erneuter Gefriertrocknung erhielt man 63 mg Peptid. Das Absorptionsspektrum entspricht dem Produkt der HBr-Abspaltung.
Im Test nach Sayers ergaben sich 3 I.E. / mg.

32 mg des nach Gefriertrocknung erhaltenen Produkts wurden zur weiteren Reinigung in 2,5 ml 10 %igem wässrigem Methanol gelöst und bei 15000 U/min von einer leichten Trübung abzentrifugiert. Chromatographie über eine 2 x 40 cm Säule mit CM-Cellulose mit einem KCl-Gradienten (H_2O / 1 m KCl ; 500 ml Gefäße) ergab 3 Fraktionen (Abb.13).

Entsalzung der Einzelfraktionen erfolgte nach Gefriertrocknung über eine 2 x 100 cm Säule mit Sephadex G-25 superfine. Dabei trennte jede Einzelfraktion der Gradientenelution in drei Peaks auf. Die 9 Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert. Die Aminosäureanalyse ergab keine eindeutigen Ergebnisse, da zu wenig Substanz von den einzelnen Fraktionen vorhanden war.

5. Synthese der ACTH-Sequenz 14 - 20

a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz

6 g Harz der Kapazität 1,03 meq / g in 50 ml Äthanol, wurden mit 2,17 g (10 mMol) BOC-Val-OH und 1,4 ml (10 mMol) Triäthylamin 60 Stunden bei 80° C am Rückfluß gekocht. Dann wurde dekantiert und mit Äthylacetat gewaschen.

b) Acetylierung der nicht veresterten Chlormethyl-Gruppen

Die Acetylierung des Harzes erfolgte bei 90° C mit 6 ml (64 mMol) Acetanhydrid und 15 ml (110 mMol) Triäthylamin in einer Lösung von 50 ml Äthylacetat innerhalb 5 Stunden.

Nach Waschen mit 3 x 40 ml Äthylacetat und 3 x 40 ml Äthanol wurde das gebildete Chlorid titriert. Es wurden 1,26 mMol Chlorid titriert. Erneute Reaktion mit 40 ml 10 %iger Lösung von Triäthylamin in DMF ergab noch 0,07 mMol Chlorid. Somit wurden 0,22 mMol Chlormethylgruppen pro Gramm Harz acetyliert.

Die Chlorid-Titration nach der ersten BOC-Abspaltung ergab 1,92 mMol Chlorid, d.h. 0,32 mMol Valin wurden pro Gramm Harz verestert.

c) Synthesezyklus

Nach Waschen des Harzes mit 3 x 40 ml DMF und 2 x 40 ml Äthanol wurde folgender Reaktionszyklus durchgeführt:

1. Waschen mit 3 x 40 ml Eisessig
2. 40 Minuten mit 40 ml 1N-HCl / Eisessig schütteln
3. Waschen mit 3 x 40 ml Eisessig
4. Waschen mit 2 x 40 ml Äthanol
5. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
6. 10 Minuten mit 40 ml einer 10 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF schütteln
7. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
8. Waschen mit 3 x 40 ml Methylenchlorid
9. Titration der Chlorid-Ionen nach Volhard

10. Ankuppeln der nächsten Aminosäure

    10 mMol BOC-Aminosäure)
    10 mMol DCCI) in 20 ml CH_2Cl_2
)

    Reaktionsdauer: siehe Tabelle 5

11. Waschen mit 3 x 40 ml Methylenchlorid
12. Wiederholung des Kupplungsschrittes:

    10 mMol BOC-Aminosäure)
    10 mMol DCCI) in 20 ml CH_2Cl_2
)

13. Waschen mit 3 x 40 ml Methylenchlorid
14. Waschen mit 3 x 40 ml DMF
15. Acetylierung:
    20 Minuten mit 40 ml einer 4 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF und 6 ml (64 mMol) Acetanhydrid schütteln

Bei der Kupplung von BOC-Arg(BOC)- OH wurde dem Methylenchlorid soviel DMF zugesetzt, bis das Produkt vollständig in Lösung gegangen war.
Den Verlauf der Chlorid-Titration zeigt Abbildung 18.

d) Abspaltung des Peptids vom Harz

Die Abspaltung erfolgte in Trifluoressigsäure mit Bromwasserstoff und 30 Minuten Reaktionsdauer. Die Trifluoressigsäure war zuvor mit Bromwasserstoff gesättigt worden. Das Peptid erhielt man durch Ausfällen mit Äther. Ausbeute: 58,8 mg.

Die Reinigung erfolgte chromatographisch an CM-Cellulose (2 x 40 cm) mit einem KCl-Gradienten (H_2O / 1 m KCl; 500 ml Gefäße). Das Elutionsdiagramm zeigt die Abb.19. Entsalzung der zuvor lyophilisierten Fraktionen wurde an Sephadex G-25 superfine (2 x 100 cm) durchgeführt. Jede Fraktion spaltete dabei in Haupt- und Nebenpeaks auf (Abb.20-23). Die Aminosäureanalyse zeigte, daß manche Fraktionen keine Ninhydrin-positiven Substanzen enthielten.

6. Synthese von Antamanid

a) Verknüpfung der ersten Aminosäure mit dem Harz

10 g Harz der Kapazität 1,8 meq/g wurden in 70 ml Äthanol suspendiert und mit 2,5 g (9,5 mMol) BOC-Phe-OH und 1,1 ml (8 mMol) Triäthylamin für 40 Stunden am Rückfluß gekocht. Dann wurde mit 3 x 50 ml Äthanol 3 x 50 ml DMF und 3 x 50 ml Methylenchlorid gewaschen.

b) Synthesezyklus

1. Waschen mit 3 x 50 ml Eisessig
2. 40 Minuten mit 50 ml 1 N-HCl / Eisessig schütteln
3. Waschen mit 3 x 50 ml Eisessig
4. Waschen mit 2 x 50 ml Äthanol
5. Waschen mit 3 x 50 ml DMF
6. 20 Minuten mit 50 ml einer 10 %igen Lösung von Triäthylamin in DMF schütteln
7. Waschen mit 3 x 50 ml DMF
8. Waschen mit 3 x 50 ml Methylenchlorid
9. Titration der Chlorid-Ionen nach Volhard
10. Ankuppeln der nächsten BOC-Aminosäure:

    20 mMol BOC-Aminosäure)
    20 mMol DCCI) in 40 ml CH_2Cl_2
)

    Reaktionsdauer: 2 Stunden
11. Waschen mit 3 x 50 ml Methylenchlorid
12. Waschen mit 3 x 50 ml Äthanol
13. Waschen mit 3 x 50 ml Eisessig
14. Waschen mit 2 x 50 ml Äthanol
15. Waschen mit 3 x 50 ml DMF

Die Titration der Chlorid-Ionen nach der Abspaltung der BOC-Gruppe der ersten Aminosäure (Phe) ergab

3,62 mMol Chlorid; d.h. 0,36 mMol Aminosäure wurden pro Gramm Harz verestert. Dieser Wert blieb während der ganzen Synthese konstant.

c) Abspaltung des Peptids vom Harz

Das Harz wurde in 100 ml Trifluoressigsäure suspendiert und das Peptid mit Bromwasserstoff innerhalb 90 Minuten abgespalten. Nach Abfiltrieren vom Harz und Fällen des Peptids mit Äther erhielt man 2,55 g Peptid = 68,7 % d.Th. bezogen auf verestertes Phenylalanin. Die Aminosäureanalyse ergab in bester Übereinstimmung mit der Theorie

gef.	Pro 4,0	Val 0,95	Ala 1,0	Phe 4,0
theor.	Pro 4	Val 1	Ala 1	Phe 4

d) Cyclisierung des Linearpeptids

130,4 mg (0,125 mMol) Phenylalanyl-Prolyl-Prolyl-Phenylalanyl-Phenylalanyl-Valyl-Prolyl-Prolyl-Alanyl-Phenylalanin wurden in 7,5 ml DMF unter Rühren gelöst. Die Lösung wurde auf 0° C abgekühlt und mit 0,13 ml (0,137 mMol) Chlorameisensäureäthylester versetzt. Nach 10 Minuten Rühren gab man 0,24 ml (0,145 mMol) Triäthylamin hinzu. Es wurde noch 20 Minuten bei 0° C und 30 Minuten bei Zimmertemperatur weitergerührt. Die Lösung wurde dann eingedampft und der Rückstand ohne weitere Reinigung massenspektrometrisch untersucht.

D. Zusammenfassung

Es wurde die Synthese verschiedener Peptide nach der Merrifield-Methode durchgeführt. Dabei ließ sich zeigen, daß zu einem gewissen Anteil Fehlpeptide entstehen. Diese lassen sich bei der Synthese unkomplizierter Peptide, wie $(Leu\text{-}Ala)_6$, bei Acetylierung der beim Kupplungsschritt freigebliebenen Aminogruppen der Aminokomponente fast vollständig unterdrücken ($< 0{,}1$ %).

Bei der Synthese komplizierter Sequenzen, wie des ACTH (14-20)-heptapeptids, traten jedoch Schwierigkeiten auf. So wurden sehr niedere Kupplungsausbeuten bei der Verknüpfung von Arginin mit Arginin und von Lysin mit Arginin festgestellt. Diese schlechten Ausbeuten lassen sich durch sterische Hinderung und Nebenreaktionen der mehrfunktionellen Aminosäuren erklären, wie sie auch bei der konventionellen Peptid-Synthese auftreten.

Wie die physiologischen Aktivitäten der ACTH-aktiven Peptide — Corticotropin (1-39)-nonatriacontapeptid und Corticotropin (1-20)-eicosapeptid — zeigen, wurde stets in geringer Ausbeute das gewünschte Produkt erhalten. Letzteres ließ sich jedoch mit Hilfe der angewandten Reinigungsmethoden nicht rein isolieren.

Die Synthese des Linearpeptids von Antamanid verlief ohne Schwierigkeiten. Das Peptid wurde in sehr guter Ausbeute und Reinheit innerhalb weniger Tage synthetisiert und isoliert. Seine Identität mit dem gewünschten Produkt ließ sich durch Cyclisierung und anschließende massenspektrometrische Untersuchung beweisen.

Literaturverzeichnis

1. Karlson, P. — Biochemie, G.Thieme Verlag, Stuttgart (1964)

2. Schwyzer, R. — Ann.Rev.Biochem. 33,259 (1964)

3. White, W.F. — J.Am.Chem.Soc. 75,503 (1953)

4. Bell, P.H. — J.Am.Chem.Soc. 76,5565 (1954)

5. Li,C.H., Geschwind,I.I., Levy,A.L., Harris,J.I., Dixon, J.S., Pon,N.G., Porath,J.O. — Nature 173,251 (1954)

6. Lee,T.H., Lerner,A.B., Buettner-Janusch,V. — J.Am.Chem.Soc. 81,6084 (1959)

7. White, W.F., Landmann,M.A. — J.Am.Chem.Soc. 77,1711 (1955)

8. Li,C.H. Geschwind,I.I., Cole,R.D., Raacke,I.D., Harris,J.I., Dixon, J.S. — Nature 176,687 (1955)

9a.	Schwyzer,R., Sieber,P.	Nature 199,172, (1963)
9b.	Schwyzer,R., Sieber,P.	Helv.chim.Acta 49,134 (1966)
10.	Merrifield,R.B.	J.Am.Chem.Soc. 85,2153 (1963)
11.	Merrifield,R.B.	Science 150,178 (1965)
12.	Merrifield,R.B.	Endeavour 24,3 (1965)
13.	Merrifield,R.B.	Biochemistry 3,1385 (1964)
14.	Marshall,G.R., Merrifield,R.B.	Biochemistry 4,2394 (1965)
15.	Marglin,A., Merrifield,R.B.	J.Am.Chem.Soc. 88,5051 (1966)
16.	Bayer,E., Jung,G., Hagenmaier,H.,	Tetrahedron 24,4853 (1968)
17.	Bayer,E., Hagenmaier,H.	Tetrahedron Letters 17,2037 (1968)
18.	Manning,D.T.	J.Am.Chem.Soc. 90,1348 (1968)
19.	Beyermann,H.C.	Rec.trav.chim.Pays-Bas 87,257 (1968)

20. Rutte, ., Merrifield, R.B. — J.Am.Chem.Soc. 91,501 (1969)

21. Losse, G., Zeidler, D., Grieshaber, Th. — Liebigs Ann.Chem. 715,196 (1968)

22. Grahl-Nielsen, O., Tritsch, G.L. — Biochemistry 8,187 (1969)

23. Sheehan, J.C., Hess, G.P. — J.Am.Chem.Soc. 77,1067 (1965)

24. Bayer, E., Eckstein, H., Hägele, K., König, W.A., Brüning, W., Hagenmaier, H., Parr, W. — J.Am.Chem.Soc. im Druck

25. Bayer, E. — Chem.f.Labor u. Betrieb 5,193 (1969)

26. Bayer, E., Hagenmaier, H., Jung, G., König, W.A. — in Peptides 1968 E.Bricas, ed., North-Holland Publ.Comp. Amsterdam 1968,162

27. Bayer, E., König, W.A. — J.Chrom.Science 7,95 (1969)

28. Bayer, E. — in Proc.1st American Peptide Symposium, Marcel Dekker, N.Y. im Druck

29. Weygand,F., Prox,A., Fessel,H.H., Kun Sun,K.Z. — Z.Naturforschg. 20b,1169 (1965)

30. Bayer,E., Hagenmaier,H., König,W.A., Pauschmann,H., Sautter,W. — Z.Analyt.Chem. 243,670 (1968)

31. Merrifield,R.B. — J.Am.Chem.Soc. 85,2149 (1963)

32. Eckstein,H. — Dissertation Universität Tübingen unveröffentlicht

33. Bodansky,M. — Nature 175,685 (1964)

34. Bodansky,M., Sheehan,I.T. — Chem.and Ind. 1964,1423 (1964)

35. Bodansky,M., Sheehan,I.T. — Chem.and Ind. 1966,1527 (1966)

36. Wünsch,E., Fontana,A., Drees,F. — Z.Naturforschg. 22b,607 (1967)

37. Yajima,H., Okuda,Y., Kinomura,Y., Minami,H. — J.Am.Chem.Soc. 90,527 (1968)

38. Okamoto,M., Kimoto,S., Oshima,T., Kinomura,Y., Kawasaki,K., Yajima,H. — Chem.Pharm.Bull.(Tokyo) 15,1621 (1967)

39. Spies,J.R., Chambers,D.C. — Analyt.Chem. 21,1249 (1949)

40. du Vigneaud,V., Behren,O.K. — J.Biol.Chem. 117,27 (1937)

41. Blake,J. Li,C.H. — J.Am.Chem.Soc. 90,5882 (1968)

42. Sayers,M.A., Sayers,G., Woodbury,L.W. — Endocrinology 42,379 (1949)

43a. Sakakibara,S., Shimonishi,Y., Kishida,Y., Okada,M., Sugihara,H. — Bull.Chem.Soc.Japan 40,2164 (1967)

43b. Sakakibara,S. — in Peptides 1964

44a. Li,C.H., Meienhofer,J., Schnabel,E., Chung,D., Lo,T., Ramachandran,J. — J.Am.Chem.Soc. 82,5760 (1960)

44b. diese Autoren — J.Am.Chem.Soc. 83,4449 (1961)

45. Marshall,G.R. — Internat.Symposium über hormon.Polypeptide Mailand (1967)

46. du Vigneaud,V., Gish,D.T., Katsoyannis,P.G. — J.Am.Chem.Soc. 76,4751 (1954)

47. Gish,D.T., Carpenter,F.H. — J.Am.Chem.Soc. 75,5872 (1953)

48. Kappeler,H. — Helv.chim.Acta 44,477 (1961)

49. Wünsch,E. — Z.Naturforschg. 22b,1269 (1967)

50. Schwyzer,R., Rittel,W., Costopanagiotis,A. — Helv.chim.Acta 45,2473 (1962)

51. Schwyzer,R., Kappeler,H. — Helv.chim.Acta 46,1553 (1963)

52. Rittel,W. — Helv.chim.Acta 45,2465 (1962)

53. Wieland,Th., Lüben,G., Ottenheym,H., Faesel,J., de Vries,J.X., Konz,W., Prox,A., Schmid,J. — Angew.Chem. 80,209 (1968)

54. Wieland,Th. — Fortschr.Chem.org. Naturstoffe Wien,25,214 (1967)

55. Wieland,Th., Faesel,J., Konz,W. — Liebigs Ann.Chem. 722,197 (1969)

56. Boissonas,R.A., Schumann,I. — Helv.chim.Acta 35,2229 (1952)

57. Prox,A., Scmid,J., Ottenheym,H. — Liebigs Ann.Chem. 722,179 (1969)

58. Wieland,Th., Birr,Ch. — pers.Mitteilung unveröffentlicht

59. Bayer,E., Hagenmaier,H., Jung,G., König,W. — Proc.IXth Europ. Peptide Symp. Orsay, April 1968

60. Bayer,E., Jung,G., König,W. — Z.Naturforschg. 22b,924 (1967)

61. Sakakibara,S., Shimonishi,S. — Bull.Chem.Soc.Japan 38,1412 (1965)

62. Weygand,F., Obermaier,R. — Z.Naturforschg. 23b,1390 (1968)

63. Schnabel,E. — Liebigs Ann.Chem. 702,188 (1967)

64. Schwyzer,R., Sieber,P., Kappeler,H. — Helv.chim.Acta 42,2622 (1959)

65. Carpino,L.A. — J.Am.Chem.Soc. 79,4427 (1957)

66. Jung,G. — Dissertation Universität Tübingen 1967

67. Hägele,K. — Diplomarbeit Universität Tübingen 1967

68. Schwyzer,R. — U.S.Patent 3 247 182

69. König,W. — Dissertation Universität Tübingen 1968

70. Weygand,F., Prox,A., Jorgensen,E.C., Axen,R., Kirchner,P. — Z.Naturforschg. 18b,93 (1963)

71. Roe,J.H., Kuether,C.A. — J.Biol.Chem. 147,399 (1943)

72. Bayer,E., Gil-Av,E., Napakarpsin,H., Ono,J., Parr,W. — J.Am.Chem.Soc. im Druck

73. Bayer,E.,
Hagenmaier,H.,
Jung,G.,
Parr,W.,
Eckstein.,
Hunzicker,P.,
Sievers,B.

Proc. Xth Europ.
Peptide Symp.
Padua, 1969

Lebenslauf

Am 7.Oktober 1941 wurde ich als Sohn des Elektromeisters Otto Hägele und seiner Ehefrau Paula,geborene Gaugler,in Stuttgart geboren.

Nach vier Jahren Grundschule in Eßlingen am Neckar trat ich am gleichen Ort in das naturwissenschaftliche Gymnasium ein.Dort legte ich im März 1961 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1961 begann ich mit dem Chemiestudium an der Universität Tübingen.Die Diplom-Vorprüfung legte ich im Mai 1964,die Diplom-Hauptprüfung im Mai 1967 ab.

Unter Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer führte ich von Juni 1967 bis Oktober 1967 die experimentelle Diplomarbeit und von November 1967 bis November 1969 die experimentelle Doktorarbeit durch.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich den Herren Professoren
E.BAYER, W.BUES, A.GOTTSCHALK, M.HANACK, G.KORTÜM, H.KRÜGER, H.MAUSER, G.MÖLLENSTEDT, EU.MULLER, G.OPITZ, W.RÜDORFF, F.SCHNEIDER, H.G.TRIESCHMANN, G.WEITZEL.

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51

Druck: Polyfoto Dr. Vogt KG
Stuttgart 1, Königstraße 51
Telefon 295681